

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA

MODULAÇÃO DA NOCICEPÇÃO EM CAMUNDONGOS POR RECEPTORES
ET_B PARA ENDOTELINAS: ENVOLVIMENTO DE MECANISMOS OPIÓIDES

MARCÍLIA BATICY MONTEIRO MORAIS FERNANDES

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito à obtenção do Título de Mestre em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Giles Alexander Rae

Florianópolis/SC, Fevereiro de 2006.

FERNANDES, Marcília. Modulação da nocicepção em camundongos por receptores ET_B para endotelinas: envolvimento de mecanismos opióides. Florianópolis, 2006. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Curso de Pós-Graduação em Farmacologia, Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC.

Orientador: Giles Alexander Rae

Defesa: 14/02/2006

O presente estudo investigou a importância de receptores ET_B para endotelinas na modulação da resposta de camundongos à aplicação de estímulos nociceptivos químico e térmico e mecânico não nociceptivo na pata traseira. A administração intraplantar de sarafotoxina S6c, um agonista seletivo de receptores ET_B, causou hiperalgesia à formalina e à capsaicina e também causou alodinia mecânica, mas não afetou a reatividade à estimulação térmica. As curvas para estes efeitos da sarafotoxina S6c apresentaram formato de sino, ou seja, doses mais elevadas foram inefetivas em causar hiperalgesia química ou alodinia mecânica. Contudo, estas mesmas doses elevadas de sarafotoxina S6c apresentaram efeito hiperalgésico e alodínico quando administradas junto com naltrexona, um antagonista não seletivo de receptores opióides. Antagonistas seletivos de receptores opióides dos tipos μ (CTOP ou naloxonazina) ou κ (Nor-BNI), mas não δ (naltrindole), também conferiram efeito hiperalgésico à sarafotoxina S6c sobre a segunda fase da resposta nociceptiva à formalina. Os resultados indicam que receptores ET_B sensibilizam a pata de camundongos a estímulos nocivos químicos e mecânico não nocivo. Contudo, a intensidade desta influência hiperalgésica e alodínica dos receptores ET_B é limitada pelo acoplamento adicional destes a um mecanismo analgésico envolvendo a ativação de um sistema opioidérgico local.

Palavras-chave: [endotelinas], [ET_B], [hiperalgesia], [opióides].

Dedicatória

Aos amores da minha vida: meu esposo Gabriel, pela existência e presença nesta longa caminhada e meu filho Luíz Afonso, minha alegria e fonte inesgotável de inspiração.

Aos meus pais Paulo José e Maria Livramento e meus irmãos Simão, Ana, Paulo João, Mónica e Paulo Ricardo por todo o amor e apoio, apesar das saudades.

Agradecimentos

Especialmente ao Prof. Dr. Giles Alexander Rae, por ter-me acolhido e orientado durante este período importante da minha vida, e de quem adquiri um grande aprendizado.

Aos colegas e amigos do laboratório do professor Giles, Emerson, Maria Fernanda, Janice, Juliana, Kathryn e Patrícia, pelo companheirismo e amizade.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia da Universidade Federal de Santa Catarina, por compartilharem a sua sabedoria.

A todos os colegas de curso e funcionários deste departamento, especialmente o Pedro pela sua ajuda com a manutenção dos animais.

À CAPES pelo apoio financeiro e ao PEC-PG pela oportunidade.

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIACÕES.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMO.....	iv
SUMMARY.....	v
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. OBJETIVOS.....	17
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
3.1. Animais.....	20
3.2. Drogas e Soluções.....	20
3.3. Nocicepção e hiperalgesia induzidos por Formalina.....	21
3.4. Nocicepção e hiperalgesia induzidas por Capsaicina.....	22
3.5. Hiperalgesia térmica induzida por sarafotoxina S6c e endotelina-1.....	23
3.6. Alodinia mecânica induzida por sarafotoxina S6c	24
3.7. Análise estatística.....	25
4. RESULTADOS.....	27
4.1. Modelo da formalina.....	28
4.1.1. Efeito nociceptivo induzido pela formalina.....	28
4.1.2. Influência da endotelina-1 e sarafotoxina S6c sobre o efeito nociceptivo	

induzido pela formalina.....	28
4.2. Influência da sarafotoxina S6c sobre a nocicepção induzida pela capsaicina.....	36
4.3. Influência da endotelina-1 e sarafotoxina S6c sobre a nocicepção térmica....	39
4.4. Influência da sarafotoxina S6c sobre a resposta à estimulação mecânica	42
5. DISCUSSÃO.....	45
6. CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

LISTA DE ABREVIACÕES

PBS	Salina tamponada com fosfato
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µm	Micrometro
ATP	Trifosfato de adenosina
cAMP	3'5'-adenosina-monofosfato cíclico
CEUA	Comitê de ética para o uso de animais de laboratório
CFA	Adjuvante completo de Freund
CGRP	Peptídeo relacionado ao gene da calcitonina
COX	Ciclooxigenase
DOP-R	Receptor <i>delta</i> opióide
DRG	Gânglio da raiz dorsal
ECE	Enzima conversora de endotelina
EPM	Erro padrão da média
ET	Endotelina
GDNF	Fator de crescimento de nervo derivado de células da glia
GIRK	Canais retificadores de potássio
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
i.p.	Injeção intraperitoneal
i.pl.	Injeção intraplantar
IASP	Associação Internacional para o Estudo da Dor
IB ₄	Isolectina B ₄
IL	Interleucina
KOP-R	Receptor <i>kappa</i> opióide
MOP-R	Receptor <i>mu</i> opióide
NGF	Fator de Crescimento do Nervo
NLZ	Naloxonazina
NMDa	Ácido n-metil-d-aspartato
nmol	Nanomol

NOP-R	Receptor para orfanina FQ/nociceptina
Nor-BNI	Nor-Binaltorfimina
NTX	Naltrexona
PAF	Fator de Agregação Plaquetária
PG	Prostaglandina
PKA	Proteína quinase A
PKC	Proteína quinase C
pmol	Picomol
RNA _m	Ácido ribonucléico mensageiro
s.c.	Injeção subcutânea
SP	Substância P
SRTX S6c	Sarafotoxina S6c
TGF- β	Fator de crescimento e transformação-beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral-alfa
TRPV1	Receptor vanilóide de potencial transitório 1
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UHP	Teste da placa quente unilateral

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Efeitos nociceptivos evocados pela injeção de formalina na pata posterior de camundongos.....	29
Figura 2: Influência da endotelina-1 sobre a resposta nociceptiva bifásica induzida pela formalina na pata de camundongos.....	30
Figura 3: Influência dos agonistas seletivos de receptores ET _B , sarafotoxina S6c e IRL 1620, sobre a primeira e a segunda fase da nocicepção induzida pela formalina na pata de camundongos.....	31
Figura 4: Influência do antagonista opióide não seletivo, naltrexona, sobre a primeira e a segunda fase da nocicepção induzida pela formalina na pata de camundongos.....	33
Figura 5: Influência dos antagonistas opióides seletivos <i>delta</i> , <i>kappa</i> e <i>mu</i> sobre a nocicepção induzida pela formalina na pata de camundongos.....	34
Figura 6: Influência do tempo de pré-tratamento com sarafotoxina S6c sobre o efeito nociceptivo da capsaicina na pata de camundongos.....	36
Figura 7: Influência do antagonista opióide não seletivo, naltrexona, sobre a nocicepção induzida pela capsaicina na pata de camundongos.....	37
Figura 8: Efeito da endotelina-1 sobre a resposta nociceptiva evocada por estimulação térmica radiante (modelo de <i>paw flick</i>) e influência do antagonista opióide não seletivo, naltrexona.....	39
Figura 9: Efeito da sarafotoxina S6c sobre a resposta nociceptiva evocada por estimulação térmica radiante (modelo de <i>paw flick</i>) e influência do antagonista opióide não seletivo, naltrexona.....	40
Figura 10: Curva tensão-resposta obtida após estimulação com filamentos de von Frey de peso crescente.....	42
Figura 11: Influência da injeção i.pl. de sarafotoxina S6c na alodinia mecânica evocada em camundongos.....	43

Figura 12: Esquema proposto para o mecanismo de ação da ET-1 sobre os seus receptores, ET _A e ET _B , após estimulação química, térmica e mecânica.....	59
--	----

RESUMO

O presente estudo investigou a importância de receptores ET_B para endotelinas (ETs) na modulação da resposta de camundongos à aplicação de estímulos nociceptivos químico (formalina 1% e capsaicina 0,1 μ g) e térmico (calor radiante) e mecânico não nociceptivo na superfície plantar da pata traseira. A administração intraplantar de sarafotoxina S6c (3 a 100 pmol), um agonista seletivo de receptores ET_B , potencializou as respostas nociceptivas (i.e. causou hiperalgesia) à formalina (efeito restrito apenas à segunda fase da resposta) e à capsaicina e também reduziu o limiar de reatividade à aplicação de força mecânica (i.e. causou alodinia mecânica), mas não afetou a reatividade à estimulação térmica. As curvas para estes efeitos da sarafotoxina S6c apresentaram formato de sino, ou seja, doses mais elevadas foram inefetivas em causar hiperalgesia química (100 pmol) ou alodinia mecânica (10 pmol). Contudo, estas mesmas doses elevadas de sarafotoxina S6c apresentaram efeito hiperalgésico e alodínico quando administradas junto com naltrexona (5 μ g), um antagonista não seletivo de receptores opióides. Antagonistas seletivos de receptores opióides dos tipos μ (CTOP ou naloxonazina) ou κ (Nor-BNI), mas não δ (naltrindole), também conferiram efeito hiperalgésico à sarafotoxina S6c sobre a segunda fase da resposta nociceptiva à formalina. Os resultados indicam que receptores ET_B sensibilizam a pata de camundongos a estímulos nocivos químicos e mecânico não nocivo. Contudo, a intensidade desta influência hiperalgésica e alodínica dos receptores ET_B é limitada pelo acoplamento adicional destes a um mecanismo analgésico envolvendo a ativação de um sistema opioidérgico local.

SUMMARY

The present study aimed to investigate the modulatory role of endothelin ET_B receptors on responses of mice to nociceptive chemical (formalin 1% and capsaicin 0.1 μ g) and thermal (radiant heat) and non-nociceptive mechanical stimulation of the hind paw. Intraplantar administration of sarafotoxin S6c (3 to 100 pmol), a selective ET_B receptor agonist, potentiated nociceptive responses to formalin (effect restricted to second phase only) and capsaicin (i.e. caused hyperalgesia) and reduced the threshold to responses to mechanical stimuli (i.e. caused mechanical allodynia), without affecting responses to heat. The dose-response curves to these effects of sarafotoxin S6c were bell-shaped, such that high doses of the agonist were ineffective in promoting hyperalgesia (100 pmol) or allodynia (10 pmol). However, these same high doses clearly caused chemical hyperalgesia and mechanical allodynia when injected together with naltrexone (5 μ g), a non-selective opioid receptor antagonist. Selective antagonists of μ (CTOP or naloxonazine) or κ (Nor-BNI), but not δ (naltrindole), opioid receptors also rendered the high dose of sarafotoxin S6c effective in potentiating the second phase of the nociceptive response to formalin. These results indicate that ET_B receptors sensitize the mouse hind paw to noxious chemical and innocuous mechanical stimulation. However, the magnitude of this hyperalgesic and allodynic influence of ET_B receptors can be limited by additional coupling of these receptors to a local analgesic mechanism, which involves activation of a local opioid system.

1. Introdução



A inflamação é uma resposta de defesa natural do organismo, que envolve uma interação complexa entre fatores solúveis e células, e que pode surgir em qualquer tecido em resposta a lesões traumáticas, infecciosas, isquêmicas, tóxicas ou autoimunes. Normalmente culmina em resolução e cura. Entretanto, se não ocorrer de forma apropriada, a inflamação pode levar a dano tecidual persistente, envolvendo leucócitos, outras células e colágeno (NATHAN, 2002). Acredita-se que o primeiro a definir o conceito da inflamação tenha sido o romano Aulus Cornelius Celsus, há quase 2.000 anos. Segundo ele, os sinais cardinais clássicos da inflamação são: *rubore* (vermelhidão), *calore* (aquecimento), *dolore* (dor), *tumore* (edema) e *functio laese* (perda de função). No séc XVIII, John Hunter deu a primeira definição satisfatória para a inflamação, incluindo nesse processo fenômenos importantes, como a vasodilatação e o extravasamento plasmático.

A dor pode ser considerada mais uma forma de sinalização da inflamação do que um evento realmente participativo neste processo. A dor é uma experiência complexa que envolve não apenas a transdução da informação gerada pelo estímulo nocivo, mas também o processamento cognitivo e emocional pelo cérebro. A natureza altamente subjetiva da dor é um dos fatores que dificulta a sua definição e o seu tratamento clínico. Segundo a Associação Internacional para o Estudo da Dor (IASP, 1994), a dor é uma experiência sensorial e emocional associada com potenciais ou reais lesões, tem uma conotação individual e sofre influências de experiências anteriores. A dor pode ainda ser classificada como nociceptiva, neurogênica, neuropática ou psicogênica, quando associada à estimulação excessiva dos nociceptores, lesão do tecido neuronal na periferia ou a nível central, disfunção/dano de um nervo ou mais, e fatores psicológicos,

respectivamente (MILLAN, 1999). Por outro lado, WOOLF e SALTER (2000) enquadram os tipos de dor em fisiológica (quando há ativação direta dos nociceptores), inflamatória (provocada por danos teciduais) e neuropática (provocada por lesão de células do sistema nervoso central).

Há que se distinguir os termos *nocicepção* e *dor*. O primeiro se refere a manifestações neurofisiológicas geradas por um estímulo nocivo, enquanto que o segundo envolve a percepção de um estímulo aversivo, a qual requer a capacidade de abstração e elaboração de impulsos sensoriais. Além disso, a dor não é, obrigatoriamente, proporcional ao grau da lesão (ALMEIDA *et al.*, 2004; SNEDDON, 2004).

Distribuídos de forma ubíqua no nosso organismo, os nociceptores são os responsáveis pela percepção do estímulo nocivo. Nociceptores são terminais periféricos de neurônios sensitivos primários cujos corpos celulares estão localizados nos gânglios da raiz dorsal (DRG) ou nos gânglios trigêmeos. São distribuídos em três classes principais: nociceptores térmicos (ativados por temperaturas extremas $\geq 45^{\circ}\text{C}$ ou $\leq 15^{\circ}\text{C}$), mecânicos (ativados por pressão intensa aplicada na pele) e polimodais (ativados por estímulos mecânicos, químicos ou térmicos de alta intensidade). Quando estimulados devidamente, os nociceptores são ativados e os potenciais de ação gerados são propagados até atingir áreas específicas do cérebro, onde esta informação nociceptiva é interpretada. A sensibilização dos nociceptores causa uma redução do seu limiar de ativação e, em alguns casos, atividade espontânea. As fibras nervosas são classificadas, de acordo com seu diâmetro, estrutura e velocidade de condução em do tipo A α , com maior diâmetro (12 - 22 μm), velocidade de condução rápida

(70 - 120 m/s) e fortemente mielinizadas; do tipo A β , também com grande diâmetro ($> 10 \mu\text{m}$), velocidade de condução rápida (30 -100 m/s) e fortemente mielinizadas; fibras do tipo A δ , com diâmetro intermediário (2 - 6 μm), velocidade de condução moderada (12 - 30 m/s) e fracamente mielinizadas; e as do tipo C com menor diâmetro (0,4 - 1,2 μm), velocidade de condução lenta (0,5 - 2,0 m/s) e não-mielinizadas. Na pele, essas fibras ocorrem na seguinte proporção: 20% (A α e A β), 10% (A δ) e 70% (C) (para revisão ver MILLAN, 1999; ALMEIDA *et al.*, 2004; DJOUHRI *et al.*, 2004; COUTAUX *et al.*, 2005).

As fibras A α e a maioria das fibras A β detectam estímulos suaves e não dolorosos aplicados na pele, músculos e articulações, contribuindo para a propriocepção sem responder diretamente a estímulos nocivos. Já as fibras A δ e C medeiam a dor aguda rápida e a dor difusa lenta, respectivamente. Existem duas principais classes de fibras A δ , as do tipo I e as do tipo II. Ambas respondem a estímulos mecânicos intensos, porém diferem quanto ao limiar de estímulo térmico e à forma como são afetadas por um dano tecidual. As fibras A δ do tipo I têm mecanoreceptores de alto limiar, ou seja, respondem principalmente a estímulos mecânicos de alta intensidade e são pouco sensíveis a estímulos térmicos ou químicos. As do tipo II representam fibras com receptores mecanotérmicos para altas temperaturas (45 a 53 °C) e alguns receptores para frio intenso (≤ 15 °C). Essas fibras conduzem informações específicas, com marcada intensidade e curta duração. Por outro lado, a maioria das fibras C é do tipo polimodal, ou seja, são termossensíveis (respondendo ao frio e ao calor), mecanoreceptores de baixo limiar e receptores específicos para substâncias

algogênicas endógenas como íon potássio, acetilcolina, enzimas proteolíticas, serotonina, prostaglandinas, substância P e histamina entre outras (Bradicinina). Além disso, muitas fibras C com receptores de limiar mais elevado respondem igualmente a estímulos térmicos, mecânicos e químicos, como ácido (i.e. prótons H^+) ou capsaicina, o ingrediente ativo da pimenta vermelha. Cerca de 10 a 20 % de fibras C são nociceptores silenciosos (vísceras) que, geralmente, não são ativados por estimulação nociva, mas seu limiar de disparo é dramaticamente reduzido pela inflamação e por vários danos químicos. A ativação desses nociceptores durante uma reação inflamatória pode contribuir ativamente para o desenvolvimento da hiperalgesia secundária e a sensibilização central. As fibras C podem também ser classificadas como peptidérgicas e não-peptidérgicas. Propagam informações num ritmo mais lento e na seqüência da ação de fibras A δ aferentes (JULIUS & BASBAUM, 2001; BASBAUM & JESSEL, 2003, ALMEIDA *et al.*, 2004; DJOUHRI *et al.*, 2004; GARRY *et al.*, 2004; COUTAUX *et al.*, 2005).

As fibras C peptidérgicas expressam substância P (SP) e o peptídeo relacionado ao gene da calcitonina (CGRP) e dependem de uma neurotrofina, fator de crescimento de nervo (NGF), para seu desenvolvimento. Já as não peptidérgicas são identificáveis pela presença da isolectina IB4, por expressarem receptores purinérgicos excitatórios da subclasse P2X₃ ao trifosfato de adenosina (ATP), em suas terminações nervosas, bem como por dependerem de outra neurotrofina, fator de crescimento de nervo derivado de células gliais (GDNF), para se desenvolverem (WILLIS & COGGESHALL, 1991; LAWSON *et al.*, 1992; HÖKFELT *et al.*, 1994; KASHIBA *et al.*, 1996).

As fibras aferentes nociceptivas terminam predominantemente no corno dorsal da medula espinhal. Este é subdividido em seis camadas (lâminas de Rexed) distintas, de acordo com as características citológicas dos seus neurônios; ou seja, classes de neurônios aferentes primários que conduzem modalidades diferentes terminam em lâminas distintas do corno dorsal. Neurônios nociceptivos secundários (de projeção) estão localizados no corno dorsal superficial, na lâmina I e na lâmina II (substância gelatinosa). A maioria desses neurônios recebe informação sináptica de fibras A δ e C. Alguns neurônios da camada I respondem exclusivamente a estimulação nociva (neurônios nociceptivos específicos) e projetam-se para centros encefálicos superiores; outros respondem de forma gradual à estimulação mecânica nociva e não-nociva (neurônios de amplo espectro dinâmico). A lâmina II é formada quase exclusivamente por interneurônios excitatórios e inibitórios, alguns dos quais respondem apenas a aferências nociceptivas, enquanto outros respondem também a estímulos não-nocivos. As lâminas III e IV estão localizadas ventralmente à substância gelatinosa e seus neurônios recebem aferências monossinápticas de fibras A β . A lâmina V contém predominantemente neurônios de amplo espectro dinâmico que se projetam para o tronco encefálico e para regiões do tálamo. Esses neurônios recebem aferências monossinápticas de fibras A β e A δ , além das aferências de fibras C diretamente em seus dendritos ou indiretamente através de interneurônios excitatórios que, por sua vez, recebem diretamente aferências de fibras C. Muitos neurônios da lâmina V também recebem aferências nociceptivas de estruturas viscerais. Os neurônios da lâmina VI recebem aferências de fibras de grande

diâmetro de músculos e articulações e respondem a estímulos não-nocivos nas articulações. Acredita-se que esses últimos neurônios não contribuem para a transmissão de informação nociceptiva (BASBAUM & JESSEL, 2003, ALMEIDA *et al.*, 2004; GARRY *et al.*, 2004).

A estimulação de nociceptores causa liberação de glutamato entre outros neurotransmissores excitatórios das fibras aferentes primárias, que provoca potenciais sinápticos rápidos nos neurônios do corno dorsal da medula através da ativação de receptores ionotrópicos do tipo AMPA e NMDA. Agindo sobre os receptores do tipo AMPA, o glutamato é responsável pela transmissão sináptica rápida na primeira sinapse do corno dorsal; e quando se liga aos receptores do tipo NMDA promove uma resposta mais lenta. Estes últimos são altamente permeáveis ao íon cálcio, de modo que sua ativação é particularmente eficaz para promover a entrada de cálcio. A ativação de receptores NMDA exige a presença da glicina tanto quanto do glutamato; ou seja, ambos precisam estar ligados aos seus respectivos sítios específicos de ligação no receptor para que ocorra a ativação, e seus sítios de ligação são distintos. São rapidamente bloqueados pelo íon magnésio (Mg^{2+}) de forma dependente de voltagem. Por outro lado, estímulos mais intensos podem ainda provocar liberação, em associação com glutamato, de peptídeos (taquicininas e CGRP) ou ATP, que ativam seus respectivos receptores específicos. A estimulação contínua e liberação sustentada de glutamato, junto com outros neurotransmissores, pode resultar no desenvolvimento de um estado de hiperexcitabilidade de neurônios nociceptivos, que se manifesta clinicamente como hiperalgesia e alodinia (BASBAUM & JESSEL, 2003; SCHMIDTKO *et al.*, 2005).

A extensa capacidade de modulação dos nociceptores aferentes primários é singular. Eles não sinalizam apenas a dor aguda, mas também contribuem para sensações dolorosas persistentes, que ocorrem em decorrência de uma série de lesões, nas quais um estímulo inócuo passa a ser doloroso. Essa condição é denominada alodinia e pode ter duas origens diferentes: responsividade aumentada dos neurônios da medula espinhal responsáveis pela transmissão da dor (sensibilização central), ou diminuição do limiar de ativação do nociceptor (sensibilização periférica). Com a sensibilização central, a dor pode ser produzida pela ativação de fibras sensoriais primárias não nociceptivas. Sensibilização periférica ocorre quando a terminação do nociceptor é exposta a produtos do dano tecidual ou inflamação. Outro fenômeno doloroso importante, a hiperalgesia, ocorre quando um estímulo nociceptivo passa a gerar uma sensação dolorosa desproporcionalmente severa comparada à intensidade do estímulo (JULIUS & BASBAUM, 2001; BASBAUM & JESSEL, 2003, COUTAUX et al., 2005).

A primeira evidência direta de que opióides endógenos, a exemplo de analgésicos opiáceos, modulam a dor em humanos foi dada pelo estudo de LEVINE *et al.* (1978), os quais usaram um modelo de dor pós-cirúrgica dentária para avaliar a analgesia mediada por opióides. Amplamente distribuídos no cérebro, os mediadores opióides mais conhecidos são a β -endorfina, a metionina-encefalina, a leucina-encefalina, a dinorfina e as endomorfina. Os peptídeos opióides são também produzidos por muitas células não neuronais, incluindo as glândulas endócrinas e exócrinas e as células do sistema imune.

Os receptores opióides pertencem à superfamília de receptores acoplados a proteínas G (i.e. GPCR), com o domínio N-terminal extracelular, sete domínios transmembranares conectados por três alças intracelulares e três extracelulares, e o domínio C-terminal intracelular. Têm cerca de 60% de identidade entre si, com maior homologia nas hélices transmembranares e maior diferença nas porções N- e C-terminais bem como nas alças extracelulares. Os receptores opióides são ativados tanto por peptídeos opióides produzidos endogenamente quanto por várias drogas opióides (ou opiáceas) naturais (como a morfina, um dos analgésicos mais potentes), semi-sintéticas ou sintéticas (para revisão ver WALDHOER *et al.*, 2004). Há quatro subtipos de receptores opióides, cada um com seu próprio grupo de ligantes: a) *mu*, μ ou MOP-R; b) *kappa*, κ ou KOP-R; c) *delta*, δ ou DOP-R; e d) o receptor para orfanina FQ/nociceptina ou NOP-R (IUPHAR, 2005). Existe um consenso de que os opióides medeiam seus efeitos analgésicos através da ativação de receptores específicos localizados a nível espinhal, supraespinhal e periférico. Um dos mecanismos responsáveis pelos seus efeitos inibitórios parece decorrer da modulação de canais de cálcio. Estudos de co-localização têm confirmado a presença de receptores opióides em fibras C e A (PARE *et al.*, 2001), em fibras viscerais positivas para receptores TRPV1 (POONYACHOTI *et al.*, 2002) e em neurônios que expressam isolectina IB4, SP ou CGRP (MINAMI *et al.*, 1995; WENK *et al.*, 1999; BORGLAND *et al.*, 2001). Opióides endógenos ou exógenos atenuam a excitabilidade de nociceptores periféricos, a propagação de potenciais de ação, a liberação de peptídeos pró-inflamatórios (SP, CGRP) de terminais sensoriais periféricos e a vasodilatação

evocada pela estimulação de fibras-C. Todos esses mecanismos, em conjunto, resultam em analgesia e ações antiinflamatórias (para revisão ver STEIN *et al.*, 2003).

Substâncias como bradicinina, histamina, prostaglandinas (PG), leucotrienos, acetilcolina, serotonina, SP e outras taquicininas, além de prótons e radicais livres são liberadas de diferentes populações de células, mas todas atuam para reduzir o limiar de ativação dos nociceptores e algumas ativam diretamente os nociceptores. Citocinas como fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-1 (IL-1), IL-6 e IL-8, entre outras, são liberadas por células do sistema imune que são atraídas para o local da lesão. A bradicinina é dos mais ativos agentes causadores de dor, provavelmente devido a duas ações distintas: ela ativa diretamente tanto nociceptores A δ como C, além de aumentar a síntese e a liberação de PG pelas células vizinhas. A liberação de SP e CGRP contribui para o aumento do edema, uma vez que ambos atuam diretamente em vênulas causando vasodilatação. Também contribuem para o desenvolvimento da hiperalgesia ao promoverem a liberação de histamina dos mastócitos, que diminui o limiar de ativação dos nociceptores (ALEY *et al.*, 1999; CALIXTO *et al.*, 2000; BASBAUM & JESSEL, 2003; COUTAUX *et al.*, 2005).

Outra importante classe de mediadores pró-inflamatórios capazes de causar dor e hiperalgesia compreende as endotelinas (ET), que podem ser liberadas de diferentes tipos celulares, incluindo o endotélio. Em 1988, YANAGISAWA *et al.*, caracterizaram a endotelina-1, um peptídeo com propriedades vasoconstritoras e hipertensivas marcadas. Na verdade, a ET-1

revelou-se membro de uma família de peptídeos estruturalmente relacionados, com 21 aminoácidos (INOUE et al., 1989) e grande homologia estrutural com as sarafotoxinas (SRTX S6a-d), toxinas cardiotoxícas presentes no veneno da serpente israelense *Atractaspis engaddensis* (HAYNES & WEEB, 1993). Cada uma das ETs é sintetizada a partir de um precursor específico (i.e. uma pré-pró-endotelina específica), que é inicialmente clivado por uma enzima peptidase (furina convertase) originando uma forma biologicamente inativa intermediária chamada big-endotelina (big-ET). Por ação de uma das isoformas da enzima conversora de endotelina (ECE-1 ou ECE-2) a big-ET é convertida à forma ativa, ET. Esta última etapa pode ser bloqueada pelo fosforamidon, um potente inibidor de nepresilina (para revisão ver KEDZIERSKI & YANAGISAWA, 2001; MASAKI, 2004)

Produzidas por células endoteliais, células epiteliais das vias aéreas, macrófagos, fibroblastos, mastócitos e neurônios, entre outras células, as endotelinas exercem suas ações biológicas em mamíferos ao se ligarem a dois tipos de receptores específicos, com sete domínios transmembranares e pertencentes à superfamília de GPCRs: a) o receptor ET_A, que liga com maior afinidade ET-1 e ET-2 do que ET-3; e b) o receptor ET_B, que liga com igual afinidade as três isoformas. Ambos os receptores estão distribuídos em vários tecidos e células, porém com diferentes níveis de expressão, o que sugere a multifuncionalidade desses peptídeos (MASAKI *et al.*, 1994; MASAKI, 2004).

As ações mediadas pelos distintos receptores endotelinérgicos podem ser distinguidas pelo uso de agonistas e antagonistas seletivos. Apesar de ainda não haver agonistas seletivos para o receptor ET_A, podemos destacar dentre os

agonistas seletivos do receptor ET_B a SRTX S6c e o IRL 1620. Com relação aos antagonistas, temos os não seletivos, ou seja, que não diferenciam um tipo de receptor do outro (por exemplo, bosentan) e os que bloqueiam seletivamente receptores ET_A (BQ-123) ou ET_B (BQ-788) (MASAKI *et al.*, 1994; WEBB & MEEK, 1997; MASAKI, 2004).

Diversos estímulos ou mediadores inflamatórios podem agir como promotores do aumento dos níveis de RNAm para ET-1 e/ou da própria ET-1, em diferentes tipos celulares, sugerindo uma função pró-inflamatória desse peptídeo. Dentre eles, podemos listar o fator de crescimento e transformação β (TGF- β), o fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucinas (IL), insulina, noradrenalina, angiotensina II, trombina, bradicinina, fator de ativação plaquetária (PAF), tromboxano A₂, entre outros (YANAGISAWA *et al.*, 1988; OHLSTEIN *et al.*, 1991; OTA *et al.*, 1991; ZOJA *et al.*, 1991; EMORI *et al.*, 1992).

A expressão das endotelinas encontra-se aumentada em células de carcinomas de mama, próstata, cólon, e após lesões cutâneas (NELSON *et al.*, 1995; ALANEN *et al.*, 2000; KURBEL *et al.*, 1999; ASHAM *et al.*, 2001). As ET são capazes de induzir a liberação de agentes comprometidos com a hiperalgesia inflamatória, como TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 e fator estimulador de colônia de granulócitos (CUNNINGHAM *et al.*, 1993; HELSET *et al.*, 1993; HURIBAL *et al.*, 1992; HOFMAN *et al.*, 1998).

Inicialmente conhecida pelas suas propriedades cardiovasculares, a ET-1 tem sido amplamente implicada no processamento nociceptivo, independentemente do seu efeito vasoconstritor (para revisão ver RAE &

HENRIQUES, 1997). FERREIRA *et al.* (1989) demonstraram que a ET-1 induz hiperalgesia quando injetada na pata de ratos, de forma dependente da dose, e que esse efeito não é afetado pelo pré-tratamento com indometacina ou guanetidina. Injetada em altas doses, na articulação de ratos, a ET-1 causa incapacitação transitória, que passa a ser mais intensa e duradoura quando uma dose sub-efetiva de prostaglandina E₂ (PGE₂) é administrada na sequência. Este resultado sugere que a ET-1 pode exercer uma função hiperalgésica em certos estados inflamatórios, e esta hipótese é reforçada pelos achados (nesse mesmo estudo) de que a injeção intradérmica deste peptídeo em humanos causa coceira intensa, além de tornar a área injetada mais sensível à pressão. Os mesmos autores observaram ainda que, à semelhança do ácido acético, a ET-1 injetada i.p. causa contorções abdominais em camundongos, abolidas com o pré-tratamento com indometacina. O mecanismo proposto para este resultado é a liberação de produtos da ciclooxigenase (COX) pela ET-1, ao contrário do que foi observado com a injeção i.pl. em ratos. Vários outros estudos comportamentais têm fornecido evidências que reforçam a importância das endotelinas na dor. Dentre eles, podemos salientar a aplicação epineural de ET-1 em ratos (DAVAR *et al.*, 1998), intraperitoneal em camundongos (RAFFA & JACOBY, 1990; RAFFA *et al.*, 1996), intraarticular em ratos (DE-MELLO *et al.*, 1998), e intraplantar em camundongos (PIOVEZAN *et al.*, 2000, MENÉNDEZ *et al.*, 2003) que causam diferentes tipos de comportamentos nociceptivos. Tais achados são fortalecidos pelas evidências adicionais de que a aplicação de ET-1 ativa neurônios sensoriais em cultura (ZHOU *et al.*, 2001) ou nociceptores de ratos (GOKIN *et al.*, 2001).

Além de induzir diretamente nocicepção, a administração de ET-1 também amplifica a resposta comportamental a estímulos nocivos mecânicos em ratos (FERREIRA *et al.*, 1989) ou térmicos em camundongos (MENÉNDEZ *et al.*, 2003), e potencializa a resposta nociceptiva à formalina ou à capsaicina em camundongos (PIOVEZAN *et al.*, 1997, 1998).

No entanto, existem discrepâncias quanto aos receptores envolvidos na mediação das respostas nociceptivas e hiperalgésicas induzidas pela ET-1. A resposta à capsaicina, que decorre da ativação direta de receptores TRPV1 (*transient receptor potential vanilloid 1*, canais iônicos com potencial transitório e alta permeabilidade a íons Ca^{2+}) localizados na população de fibras C (CATERINA *et al.*, 1997), é inibida pelo antagonista de receptores ET_A BQ-123 (PIOVEZAN *et al.*, 2000). Por outro lado, é interessante ressaltar que PIOVEZAN *et al.* (1997) demonstraram que a ET-1, ET-3 e o agonista seletivo de receptores ET_B , sarafotoxina S6c, potencializaram a segunda fase da nocicepção induzida pela formalina, mas que apenas os dois primeiros foram eficazes em aumentar a primeira fase da resposta a esse agente álgico em camundongos. Esse estudo também demonstrou que o efeito hiperalgésico da ET-1 sobre a resposta à formalina é inibido pelo pré-tratamento com o antagonista misto de receptores ET_A/ET_B , bosentan. Contudo, não foram utilizados antagonistas seletivos que pudessem identificar, objetivamente, os receptores envolvidos no efeito hiperalgésico do peptídeo sobre cada uma das fases da resposta nociceptiva à formalina. Já a potencialização da nocicepção induzida pela injeção i.pl. de capsaicina em camundongos induzida pela ET-1 é passível de reversão com o antagonista seletivo de receptores ET_A BQ-123, mas não com o antagonista

seletivo de receptores ET_B BQ-788 (PIOVEZAN *et al.*, 1998, 2000). Além disso, doses maiores de ET-1 ou dos agonistas seletivos de receptores ET_B, sarafotoxina S6c ou IRL 1620, não influenciaram a resposta à nocicepção induzida pela capsaicina. No entanto, ambos receptores medeiam as contorções abdominais induzidas pela ET-3 (RAFFA *et al.*, 1996) e a hiperalgesia mecânica induzida pela ET-1 (BAAMONDE *et al.*, 2004) em camundongos, enquanto que apenas receptores ET_B estão envolvidos na hiperalgesia mecânica em ratos (Da CUNHA *et al.*, 2004, VERRI *et al.*, 2005).

Estudo realizado em ratos por KHODOROVA *et al.* (2003) demonstrou que a ET-1 também induz nocicepção na pata de ratos atuando em receptores ET_A de nociceptores periféricos, a exemplo do que é observado em camundongos (PIOVEZAN *et al.*, 2000). Porém, este efeito álgico da ET-1 na pata de ratos é limitado por um processo de analgesia desencadeado por ativação simultânea de receptores opióides, subsequente à estimulação de receptores ET_B presentes em queratinócitos. Desta forma, os receptores ET_B possuem um papel dual na modulação de respostas nociceptivas e hiperalgésicas. Conforme anteriormente proposto por DAVAR & KHODOROVA (2004), em modelos de dor inflamatória a ativação de receptores ET_B parece ser pronociceptiva (GRISWOLD *et al.*, 1999; ZOU *et al.*, 2003), enquanto que sua ativação por agonistas exógenos é claramente antinociceptiva. Estes autores sugerem ainda que baixas concentrações de ET-1 (i.e. decorrente de liberação endógena por estímulos inflamatórios) ativariam receptores ET_B desencadeando respostas nociceptivas, em contrapartida, quando ativados por altas doses de ET-1 ou de agonistas seletivos (i.e. decorrente da administração exógena) os receptores ET_B teriam

papel anti-nociceptivo. Corroborando esta premissa, De MELO *et al.* (1998) demonstraram efeitos pró-nociceptivos decorrentes da ativação de receptores ET_B apenas quando a ET-1 era liberada endogenamente através de um estímulo inflamatório.

Segundo KHODOROVA *et al.* (2003) a via analgésica periférica dependente de opióides ativada por receptores ET_B envolve canais retificadores de potássio (GIRK). Canais GIRK têm sido descritos no SNC e acredita-se que tenham um importante papel na determinação do limiar de disparo para geração de potenciais de ação, controlando assim a excitabilidade neuronal (MARK *et al.*, 2000). Ao serem ativados, esses canais promovem a saída de correntes de potássio, hiperpolarizando o nociceptor e, conseqüentemente, inibindo a sua suscetibilidade de disparo (TORRECILLA *et al.*, 2002). No entanto, a possível modulação periférica das ações nociceptivas e hiperalgésicas das endotelinas em camundongos por um mecanismo análogo ao descrito por KHODOROVA *et al.* (2003) ainda não foi investigada.

2. Objetivos



2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve por objetivo geral determinar a influência de receptores para endotelina do tipo ET_B na modulação da sensibilidade de camundongos à estimulação nociceptiva da pata traseira com estímulos álgicos químico e térmico e estimulação mecânica, bem como a possível contribuição de opióides endógenos nestes processos.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar a participação das endotelinas e seus receptores (ET_A e ET_B) sobre a resposta nociceptiva induzida pela formalina e capsaicina em camundongos;
2. Investigar o efeito dual (pró-nociceptivo e antinociceptivo) de receptores ET_B na modulação da sensibilidade de camundongos à aplicação de estímulos álgicos químicos e térmico (calor) e estimulação mecânica à pata;
3. Investigar a participação de mecanismos opióides no processo analgésico local deflagrado pela estimulação mais intensa de receptores ET_B.

3. Materiais e Métodos



3.1 – Animais

Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina. Com quatro semanas de vida, os animais foram alojados (20 no máximo) em gaiolas plásticas no Biotério Setorial da Coordenadoria de Farmacologia, em um ambiente climatizado com temperatura (23 ± 2 °C) e luminosidade (ciclo claro/escuro de 12 h) controlados, onde tiveram livre acesso a água e ração especial para roedores. Com cerca de oito semanas de vida, pesando entre 25 e 35 g, os animais foram levados ao laboratório, onde passaram por um período de adaptação, de pelo menos 24 horas, antes de qualquer teste comportamental.

Todos os experimentos a seguir descritos foram realizados entre 08:00 e 17:00 horas, respeitando o ciclo circadiano dos animais e segundo protocolos aprovados pelo Comitê de Ética para Uso de Animais de laboratório (CEUA) da Universidade Federal de Santa Catarina. É importante salientar que todos os animais foram sacrificados imediatamente após o término dos experimentos, por inalação de CO₂, a fim de minimizar o sofrimento dos mesmos.

3.2 – Drogas e Soluções

Foram utilizadas as seguintes drogas: endotelina-1 (ET-1), sarafotoxina S6c (SRTX S6c), IRL 1620 (Suc[Glu⁹, Ala^{11,15}]endotelina-1₁₀₋₂₁) provenientes da American Peptide Co., (Sunnyvale, U.S.A.); Capsaicina, Naltrexona (NTX), Naltrindole, Nor-Binaltorfimina (nor-BNI), Naloxonazina (NLZ) e CTOP (D-Phe-

Cys-Tyr-D-Trp-Orn-Thr-Pen-Thr-NH₂) obtidas da Sigma Chemical Co., (Saint Louis, U.S.A.); e formalina obtida a partir de diluição de solução de formaldeído (Nuclear, Brasil).

Soluções estoque de ET-1, SRTX S6c e IRL 1620 foram preparadas em solução salina tamponada com fosfato (*phosphate-buffered saline* - PBS) e mantidas à temperatura de -18 °C em alíquotas de 20 a 50 µl. As soluções estoque de capsaicina (1 mg/ml) foram preparadas em veículo (10% de Tween 80, 10% de Etanol, 80% de PBS) e mantidas na geladeira (4 a 8 °C). Todas as soluções estoque foram diluídas para a concentração desejada, em PBS, imediatamente antes do uso. A formalina também foi diluída para diferentes concentrações em PBS no dia do experimento. O volume de cada injeção em todos os experimentos, inclusive quando as drogas foram co-administradas, foi de 20 µl.

3.3 – Nocicepção e hiperalgesia induzidos por formalina

Para avaliar o comportamento nociceptivo evocado pela formalina, cada animal recebeu uma injeção de formalina (0,25; 0,5; 1,0; 1,5 ou 2,0%) ou veículo (PBS) na pata traseira direita. Imediatamente após a injeção, cada animal foi colocado, individualmente, sob um funil de vidro invertido, atrás do qual foi apoiado um espelho (num ângulo de aproximadamente 70° em relação à bancada) para facilitar a visualização completa do animal durante todo o período de observação. O tempo que cada animal despendeu lambendo a pata tratada foi

registrado (em s), com auxílio de um cronômetro, em intervalos de 5 min por 40 min, e considerado como índice de nocicepção. Após este período de observação do comportamento nociceptivo, os animais foram sacrificados por inalação de CO₂.

Para avaliar o efeito da endotelina ou de agonistas seletivos de seus receptores ET_B, ET-1 (3 e 10 pmol/pata), sarafotoxina S6c (3 a 100 pmol/pata), IRL 1620 (10 a 300 pmol/pata), ou PBS foram injetados 30 minutos antes da injeção ipsilateral de formalina (1%). Para avaliar a participação dos receptores opióides nesta resposta utilizou-se um protocolo previamente descrito por KHODOROVA *et al.* (2003), com algumas modificações. Animais foram tratados com sarafotoxina S6c (100 pmol/pata), a qual foi co-injetada com Naltrexona (5 µg/pata), Naltrindole (7,7 nmol/pata), Nor-Binaltorfimina (68 nmol/pata), Naloxonazina (10 nmol/pata), CTOP (1 ou 3 nmol/pata) ou PBS, 30 minutos antes da injeção ipsilateral de formalina (1%).

3.4 - Nocicepção e hiperalgesia induzidas por capsaicina

À semelhança dos experimentos realizados com formalina, cada animal recebeu uma injeção i.pl. de capsaicina 0,1 µg (PIOVEZAN *et al.*, 1998) ou veículo. Imediatamente após a injeção, cada animal foi colocado, individualmente, sob um funil de vidro invertido, atrás do qual foi apoiado um espelho (num ângulo de aproximadamente 70° em relação à bancada) para facilitar a visualização completa do animal durante todo o período de observação. O tempo que cada

animal despendeu lambendo a pata tratada foi registrado (em s), com auxílio de um cronômetro durante 5 min.

A fim de avaliar se a ativação de receptores ET_B também influenciava a resposta à capsaicina, os animais receberam sarafotoxina S6c (10 a 100 pmol/pata) 30 ou 60 min antes da injeção deste agente. Para investigar a participação de receptores opióides nesta resposta, os camundongos receberam uma injeção i.pl da maior dose utilizada de sarafotoxina S6c associada a Naltrexona (5 µg) 60 min antes da administração de capsaicina.

3.5 - Hiperalgisia térmica induzida por sarafotoxina S6c e endotelina-1

Para avaliar a influência da sarafotoxina S6c e endotelina-1 sobre a resposta dos camundongos mediante um estímulo nociceptivo térmico (calor), adaptou-se o aparelho de *tail-flick* da Ugo-Basile (Milão – Itália), para emissão de calor radiante na pata dos animais. Para tal, cada animal foi segurado pelo dorso, de forma a permitir livre movimentação das patas traseiras. A pata traseira direita foi posicionada sobre o orifício de saída do estímulo térmico (feixe de luz infravermelha) e foi selecionada a intensidade de 15 V. Para a realização dos experimentos foram selecionados animais que apresentavam limiar basal de retirada da pata de 11 ± 1 s.

Em seguida, cada animal recebeu uma injeção i.pl. de ET-1 (3 a 100 pmol) ou sarafotoxina S6c (10 e 100 pmol), sozinhas ou co-administradas com

Naltrexona (5 µg), ou PBS. A pata ipsilateral foi novamente exposta ao estímulo térmico 1, 2, 3 e 4 h após o tratamento.

3.6 - Alodinia mecânica induzida por sarafotoxina S6c

Para avaliar a influência de sarafotoxina S6c e endotelina-1 sobre a resposta de camundongos a um estímulo mecânico não nociceptivo, utilizou-se o método de von Frey manual. O primeiro passo foi determinar o menor filamento capaz de causar 50% de resposta de retirada da pata. Para tal, os animais foram habituados diariamente no aparato de experimentação (caixas de acrílico medindo 10 x 8 x 8 cm, sob uma plataforma com piso de arame) durante 2 horas, nos 3 dias anteriores e no dia do teste comportamental. Em seguida, cada animal foi submetido a 10 estimulações com cada um dos filamentos de força crescente numa escala logarítmica (0,02 a 2 g; *Touch Test*, da North Coast Medical, Morgan Hill, CA, U.S.A.). Com os dados obtidos, construiu-se uma curva força-resposta que permitiu selecionar o filamento de 1 g como sendo o menor capaz de induzir a resposta dos animais em pelo menos 50% das estimulações.

O passo seguinte foi selecionar os animais que apresentavam limiar basal à estimulação mecânica em torno de $1,0 \pm 0,3$ g. Para isso utilizou-se o método *Up and Down*, que consiste em apresentar, primeiramente, o filamento selecionado (no caso, 1 g). Se o animal responde ao estímulo, após um intervalo de pelo menos 2 min, é apresentado o filamento imediatamente menor (0,6 g),

caso o animal não responda o filamento apresentado é o imediatamente maior (1,4 g), e assim sucessivamente, até completar um total de seis estimulações.

Os animais selecionados receberam injeção i.pl. de endotelina-1 (3, 10, 30 e 100 pmol), sarafotoxina S6c (0,1; 1 e 10 pmol) ou PBS e foram submetidos à estimulação mecânica, utilizando-se o método descrito acima. Em outro grupo de animais, co-injetou-se a maior dose de sarafotoxina com Naltrexona (5 µg). A pata ipsilateral foi novamente exposta ao estímulo mecânico 1, 2, 3, 4, 24 e 48 h após o tratamento.

3.7 – Análise estatística

Todos os resultados foram apresentados como média \pm E.P.M. dos valores absolutos e avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) de uma via, ou de medidas repetidas (para múltiplas comparações entre grupos ou entre valores dentro de cada grupo, em comparação com os valores basais), conforme mais pertinente, seguida do teste de Bonferroni para comparação entre os diferentes grupos. Os dados dos experimentos de alodinia mecânica foram avaliados através de ANOVA de Kruskal-Wallis seguida pelo teste U de Mann-Whitney. Além disso, os resultados obtidos com relação aos efeitos da ET-1 e/ou sarafotoxina S6c sobre a reatividade de camundongos à estimulação térmica ou mecânica foram ainda submetidos a uma ANOVA de medidas repetidas, para comparar os valores de respostas medidas em diferentes tempos após a

administração com aqueles verificados no mesmo grupo antes do tratamento. Os valores de $P < 0,05$ foram consideradas estatisticamente significantes.

4. Resultados



4.1 - Modelo da Formalina

4.1.1 - Efeito nociceptivo e edema de pata induzidos pela formalina

A injeção i.pl. de formalina induziu nocicepção de forma dependente da dose (Figura 1). Em todas as doses testadas (0,25 a 2%), a resposta nociceptiva provocada foi tipicamente caracterizada por duas fases: a) a primeira, ocorrendo nos primeiros 5 minutos; e b) a segunda, que se manifestou a partir de 10 a 15 minutos após a injeção e se estendeu até os 40 minutos. Os resultados mostraram que as respostas nociceptivas evocadas pela formalina 0,5% (primeira fase: $62,6 \pm 4,7$ s; segunda fase: $70,5 \pm 20,5$ s) foram claramente submáximas, uma vez que diferiram significativamente ($P < 0,05$) daquelas obtidas com a injeção de formalina 2% (primeira fase: $84,0 \pm 5,6$ s; segunda fase: $280,6 \pm 50,6$ s). Entretanto, em virtude da acentuada flutuação, de um dia para outro, nos resultados obtidos com formalina 0,5%, optou-se por usar formalina 1%, que evocou respostas mais consistentes (primeira fase: $63,7 \pm 2,9$ s; segunda fase: $103,7 \pm 14,7$ s), nos experimentos subseqüentes que fizeram uso desse agente álgico.

4.1.2 - Influência da endotelina-1 e sarafotoxina S6c sobre o efeito nociceptivo induzido pela formalina

A ET-1 potencializou ambas as fases da nocicepção induzida pela formalina, quando injetada na pata ipsilateral de camundongos 30 min antes, confirmando os achados de PIOVEZAN et al. (1997). Esse efeito hiperalgésico foi estatisticamente significativo apenas com a dose de 10 pmol do peptídeo (primeira fase: $110,3 \pm 7,8$ s; segunda fase: $302,1 \pm 18,8$ s), em comparação ao grupo

controle tratado com PBS (primeira fase: $71,6 \pm 2,8$ s; segunda fase: $105,7 \pm 9,1$ s), sendo que a dose de 3 pmol mostrou-se inefetiva (Figura 2).

Já o tratamento prévio com o agonista seletivo de receptores ET_B , sarafotoxina S6c (3 a 100 pmol), injetado na pata ipsilateral 30 min antes, não afetou a primeira fase da nocicepção induzida pela formalina, mas potencializou a segunda fase, dependendo da dose administrada (Figura 3A). Nas doses de 10 e 30 pmol, a sarafotoxina S6c induziu hiperalgesia significativa ($243,0 \pm 18,6$ s e $204,1 \pm 24,0$ s respectivamente; $P < 0,05$), em comparação ao grupo controle pré-tratado com PBS ($110,5 \pm 10,6$ s). No entanto, não se observou efeito hiperalgésico quando a dose de sarafotoxina S6c foi aumentada para 100 pmol, sendo que a segunda fase da resposta à formalina neste grupo ($145,5 \pm 14,8$ s) diferiu daquele do grupo pré-tratado com 10 pmol do peptídeo ($P < 0,05$), mas não daquele pré-tratado com PBS. O tratamento prévio com IRL 1620, outro agonista seletivo de receptores ET_B , causou efeitos semelhantes aos da sarafotoxina S6c, i.e. potencialização apenas da segunda fase da resposta nociceptiva evocada pela formalina, que foi dependente da dose nas doses de 30 e 100 pmol. Quando a dose de IRL 1620 foi aumentada para 300 pmol, observou-se ainda um efeito hiperalgésico em comparação ao pré-tratamento com PBS, mas estatisticamente diferente ($P < 0,05$) e menor que aquele causado por 100 pmol desse agonista (Figura 3B).

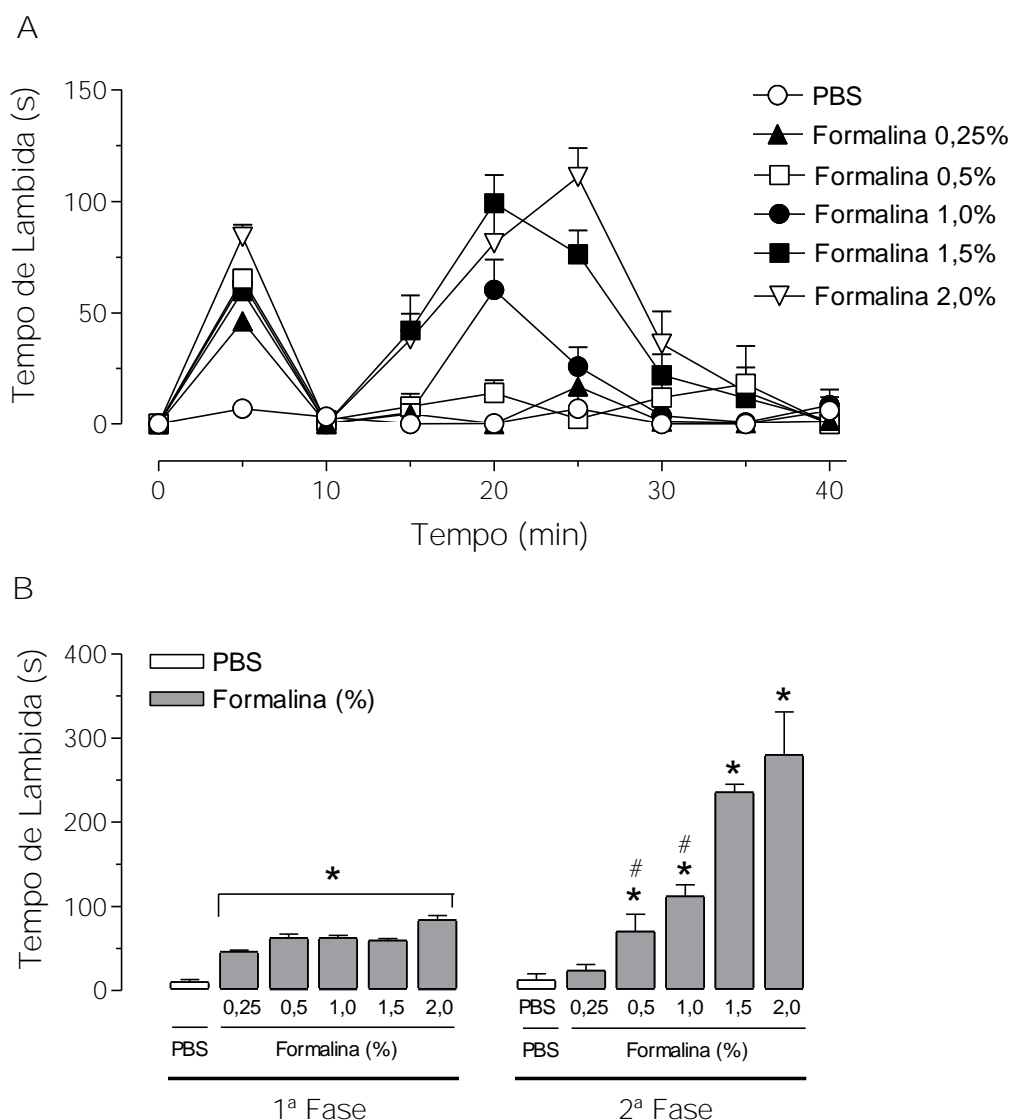


FIGURA 1: Efeito nociceptivo evocado pela injeção intraplantar de formalina (0,25 a 2,0 %, em 20 μ l) na pata posterior de camundongos. O Painel A ilustra o decurso temporal da resposta nociceptiva à formalina (nas doses indicadas) ou veículo (PBS) em intervalos de 5 min, até 40 min após a injeção. O Painel B ilustra o tempo de lambida acumulado na primeira (0-5 min) e na segunda (10-40min) fases da resposta a formalina. Os dados são apresentados como a média \pm E.P.M. (n=6-8 animais). Asteriscos (*) e cerquilhas (#) indicam $P < 0,05$ quando comparado ao respectivo valor do grupo controle (PBS) ou grupo tratado com a maior dose de formalina (2%), respectivamente (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni).

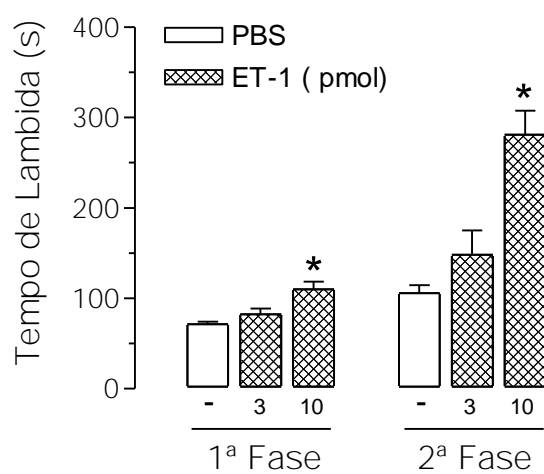


FIGURA 2: Influência da endotelina-1 (ET-1; 20 μ l/pata) sobre a resposta nociceptiva bifásica induzida pela formalina 1% na pata de camundongos. Os dados são apresentados como média \pm E.P.M. ($n = 6-8$ animais). Asteriscos (*) indicam $P < 0,05$ quando comparado ao valor do controle (PBS) (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni).

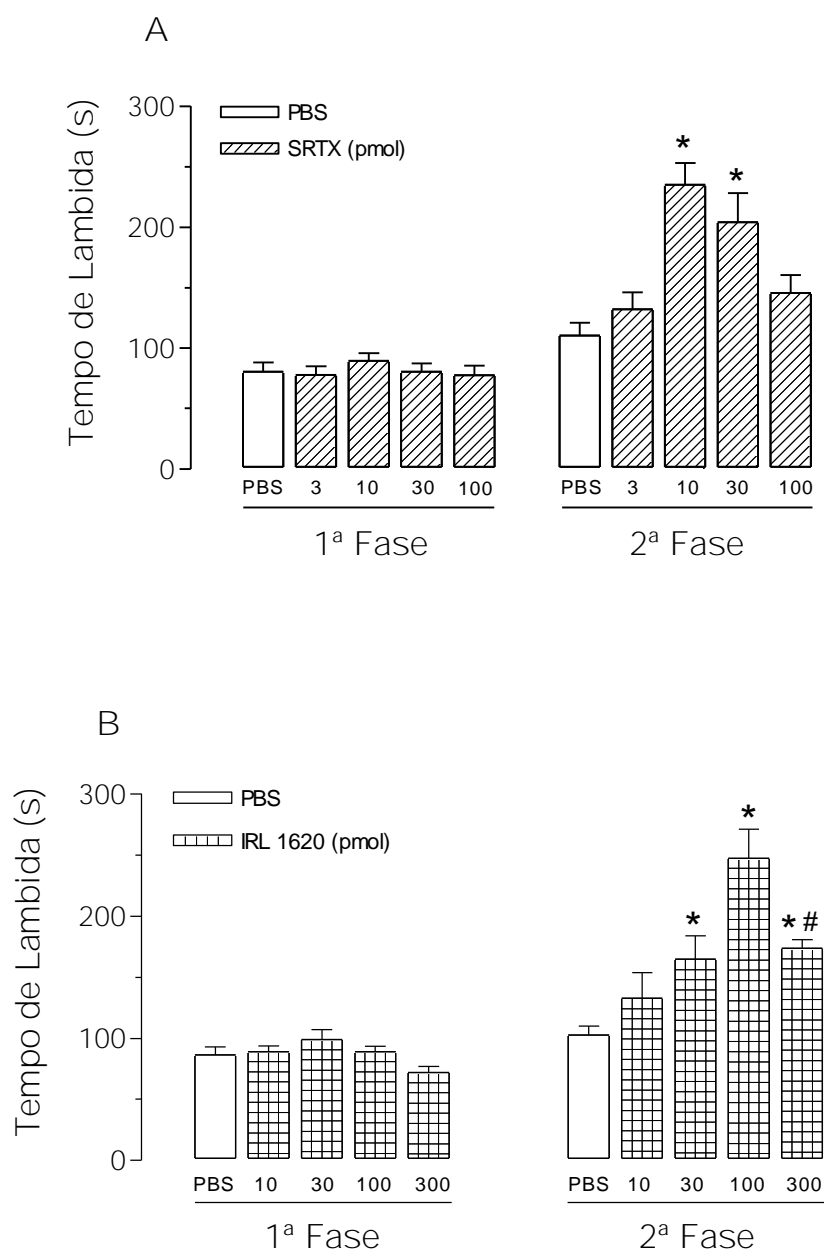


FIGURA 3: Influência dos agonistas seletivos de receptores ET_B , sarafotoxina S6c (SRTX S6c, Painei A) e IRL 1620 (Painei B), sobre a primeira (0-5 min) e a segunda (10-40 min) fase da nocicepção induzida pela formalina 1% na pata de camundongos. Os resultados são apresentados como a média \pm E.P.M. ($n = 6-8$ animais). Asteriscos (*) e cerquilhas (#) indicam $P < 0,05$ quando comparado ao valor do controle (PBS) ou do grupo tratado com a dose mais efetiva, respectivamente (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni).

Embora a sarafotoxina S6c, na dose de 100 pmol, não causasse potencialização da segunda fase da resposta à formalina, observou-se um nítido efeito hiperalgésico desta mesma dose do agonista seletivo de receptores ET_B, quando o mesmo foi co-injetado juntamente com naltrexona (5 µg/pata, i.e. 13,4 nmol/pata), um antagonista não seletivo de receptores opióides (com naltrexona: 257,4 ± 21,1 s; com PBS: 145,5 ± 14,8 s; $P < 0,05$). Em contraste, a naltrexona não influenciou *per se* a resposta nociceptiva à formalina (naltrexona: 165 ± 16,7 s; PBS: 116,9 ± 16,7 s) ou a hiperalgesia causada por 10 pmol de sarafotoxina S6c (naltrexona: 277,1 ± 33,8 s; PBS: 242,9 ± 18,6 s). Estes resultados são apresentados na Figura 4.

A Figura 5 ilustra a influência da co-injeção de antagonistas seletivos de diferentes tipos de receptores opióides, juntamente com a dose de 100 pmol de sarafotoxina S6c, sobre a segunda fase da resposta nociceptiva à formalina. A exemplo da naltrexona, tanto a nor-BNI (68 nmol; antagonista seletivo de receptores opióides *kappa*) quanto a CTOP (3 nmol) e a naloxonazina (10 nmol; ambos antagonistas seletivos de receptores opióides *mu*) foram capazes de revelar um efeito hiperalgésico da sarafotoxina S6c, aumentando a segunda fase da resposta à formalina de 128,8 ± 8,6 s para 206,2 ± 16,3; 243,1 ± 26,6 e 242,5 ± 18,9 s, respectivamente. Por outro lado, a co-injeção de 100 pmol de sarafotoxina S6c junto com o antagonista seletivo de receptores opióides delta naltrindole (7,7 nmol) não alterou significativamente a resposta à formalina (151,6 ± 17,7 s).

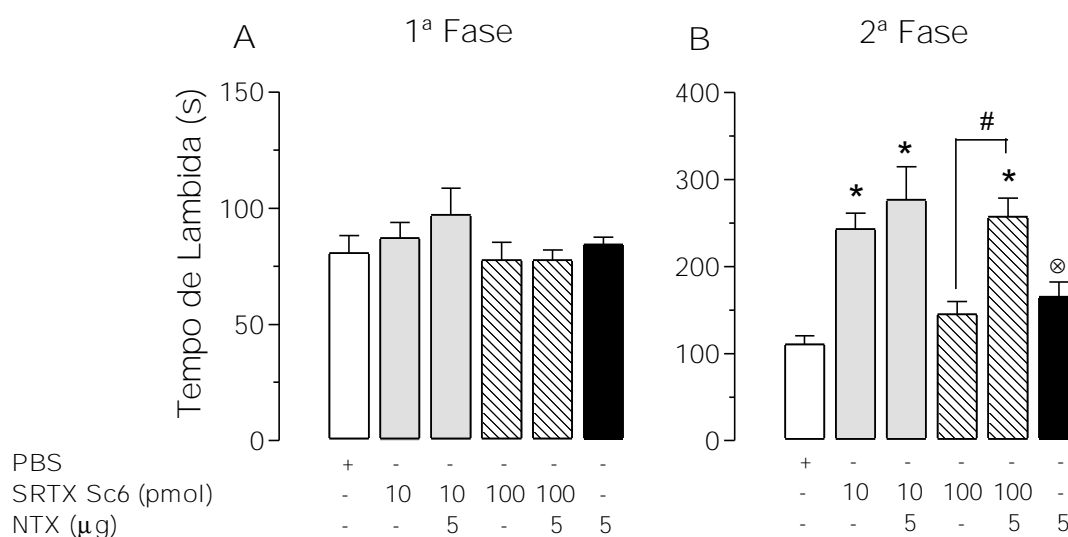


FIGURA 4: Influência do antagonista opióide não seletivo, Naltrexona 5 µg/pata (i.e. 13,4 nmol/pata), sobre a primeira (Painel A) e a segunda fase (Painel B) da nocicepção induzida pela formalina na pata de camundongos. A Naltrexona reverteu o efeito anti-hiperalgésico mediado pela sarafotoxina S6c, na segunda fase da resposta a formalina. Os resultados são apresentados como a média \pm E.P.M. ($n = 6-8$ animais). Asteriscos (*), cerquilhas (#) e círculos cruzados (⊗) indicam $P < 0,05$ quando comparado ao valor do controle (PBS) ou do agonista sozinho ou simultaneamente com o antagonista opióide, respectivamente (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni).

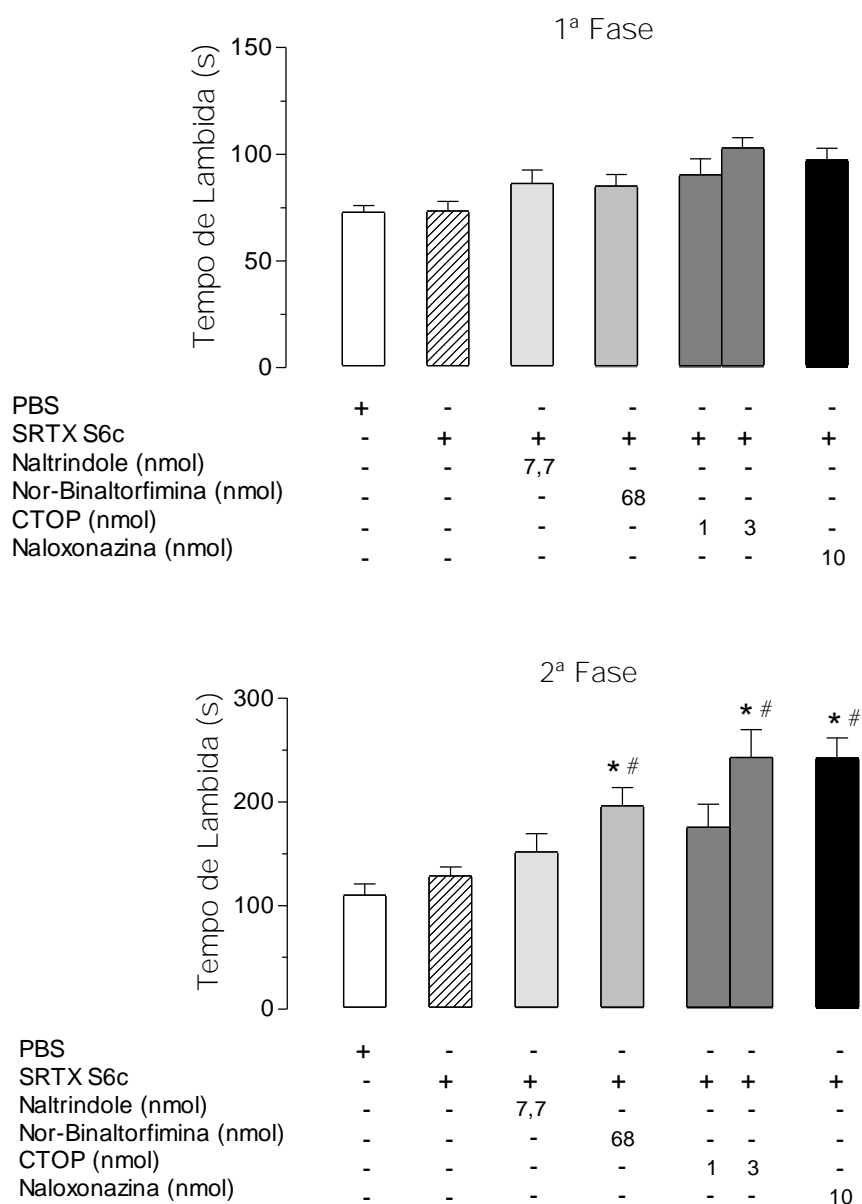


FIGURA 5: Influência dos antagonistas opióides seletivos *delta*, *kappa* e *mu* sobre a nocicepção induzida pela formalina na pata de camundongos. Nor-BNI, CTOP e Naloxonazina revertem o efeito anti-hiperalgésico mediado pela sarafotoxina S6c (100 pmol), na segunda fase da resposta a formalina. Já o Naltrindole não foi eficaz nesse aspecto. Os resultados são apresentados como a média \pm E.P.M. ($n = 8-10$ animais). Asteriscos (*) e cerquilhas (#) indicam $P < 0,05$ quando comparado ao valor do controle (PBS) ou do agonista sozinho, respectivamente (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni).

4.2 - Influência da sarafotoxina S6c sobre a nocicepção induzida pela Capsaicina

Diferentemente da formalina, que causa uma resposta nociceptiva bifásica, a capsaicina é um agente álgico que estimula receptores vanilóides específicos (TRPV-1) localizados em fibras C, para induzir uma resposta nociceptiva monofásica de curta duração (SAKURADA *et al.*, 1992). No presente trabalho, a injeção i.pl. de capsaicina (0,1 µg) induziu uma resposta nociceptiva sub-máxima (tempo de lambida de $42,0 \pm 2,5$ s; $n = 9$) de curta duração (5-10 min), que foi influenciada de formas diferentes pelo pré-tratamento com sarafotoxina S6c, dependendo da dose de agonista de receptor ET_B injetada (10, 30 ou 100 pmol) e o intervalo entre a administração deste e a capsaicina (30 e 60 min). O tratamento prévio, 30 min antes, com o agonista seletivo de receptores ET_B induziu um efeito hiperalgésico dependente da dose (PBS: $45,9 \pm 4,9$ s; sarafotoxina S6c: $50,78 \pm 3,51$; $64,75 \pm 10,22$; $68,45 \pm 6,75$ s para 10, 30 e 100 pmol, respectivamente). Contudo, quando o tempo entre as injeções de sarafotoxina S6c e capsaicina foi aumentado para 60 min observou-se que as doses de 10 e 30 pmol do agonista ET_B também aumentaram a resposta nociceptiva, de $45,9 \pm 4,9$ s (controle tratado com PBS) para $67,6 \pm 6,6$ e $76,5 \pm 9,0$ s, respectivamente ($P < 0,05$ em ambos os casos), mas a dose de 100 pmol mostrou-se inefetiva ($42,8 \pm 4,4$ s; $P > 0,05$; Figura 6). Porém, quando a mesma dose do agonista seletivo de receptores ET_B foi administrada junto com naltrexona (5 µg; i.e. 13,4 nmol) observou-se um efeito hiperalgésico significativo ($77,5 \pm 6,9$ s). Convém salientar ainda que o antagonista não seletivo de receptores opióides

não induziu *per se* qualquer alteração significativa da resposta à capsaicina (Figura 7).

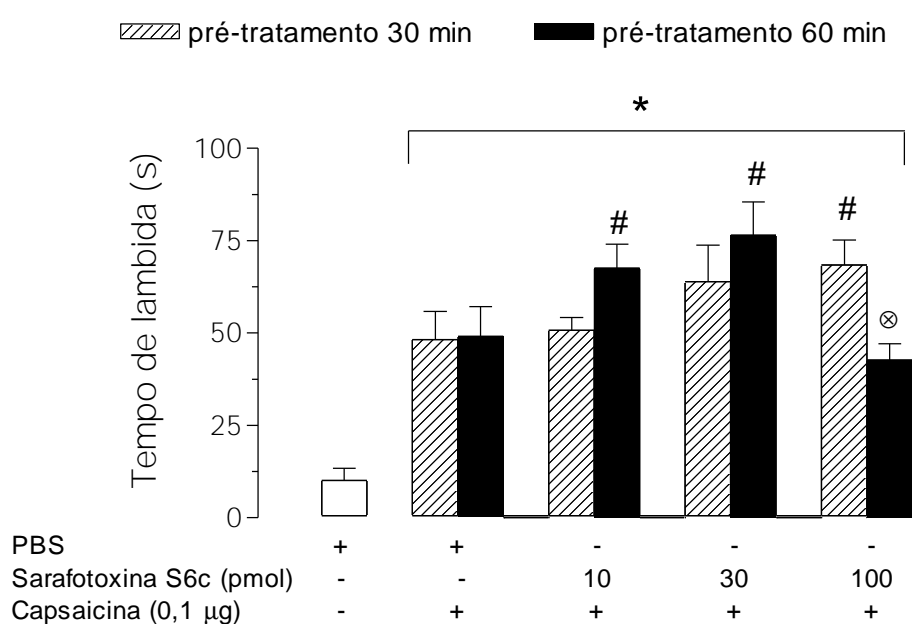


FIGURA 6: Influência do tempo de pré-tratamento com sarafotoxina S6c (10-30 pmol) sobre o efeito nociceptivo da capsaicina na pata de camundongos. Os resultados são apresentados como a média \pm E.P.M. ($n = 8-10$ animais). Asteriscos (*), cerquilhas (#) e círculos cruzados (⊗) indicam $P < 0,05$ quando comparado ao valor do controle (PBS), da capsaicina após PBS ou quando a comparação é feita entre a maior e a menor doses de sarafotoxina 60 min antes da capsaicina, respectivamente (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni).

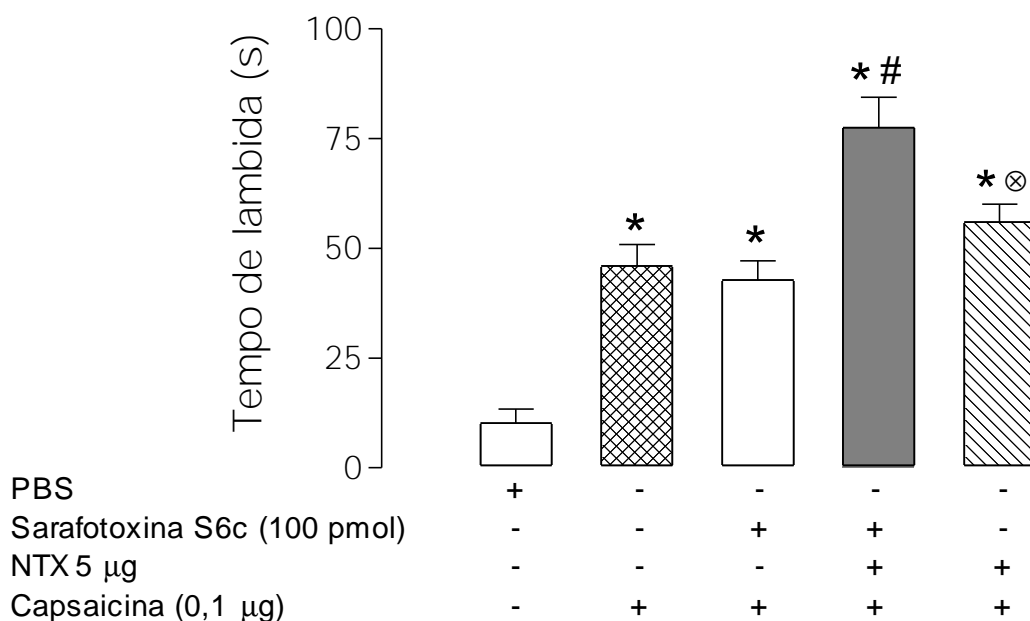


FIGURA 7: Influência do antagonista opióide não seletivo, naltrexona 5 µg/pata, sobre a nocicepção induzida pela capsaicina na pata de camundongos. Quando co-administrada junto com a maior dose de sarafotoxina S6c, a naltrexona passou a induzir um efeito hiperalgésico sobre a nocicepção a capsaicina. Os resultados são apresentados como a média \pm E.P.M. ($n = 6-8$ animais). Asteriscos (*), cerquilhas (#) e círculos cruzados (⊗) indicam $P < 0,05$ quando comparado ao valor do controle (PBS) ou do agonista sozinho ou simultaneamente com o antagonista opióide, respectivamente (ANOVA de uma via, seguida pelo teste de Bonferroni).

4.3 - Influência da sarafotoxina S6c e endotelina-1 sobre a nocicepção térmica

O tratamento com ET-1 (3, 10, 30 e 100 pmol) induziu hiperalgesia térmica de forma dependente da dose (Figura 8). As doses de 10 e 30 pmol mostraram-se efetivas e a redução da latência de retirada da pata ipsilateral foi significativa a partir da primeira hora, alcançando o pico na segunda ($8,8 \pm 0,8$ e $8,2 \pm 0,9$ s, contra $11,2 \pm 0,5$ s) e permanecendo reduzida até a terceira e quarta ($9,4 \pm 0,8$ e $9,0 \pm 0,8$ s) horas, respectivamente. A dose de 100 pmol reduziu a latência de retirada da pata tratada apenas na segunda hora ($10,1 \pm 0,6$ s), efeito esse que não foi alterado pela co-injeção de naltrexona (5 μ g). A naltrexona *per se* também não causou hiperalgesia ($10,1 \pm 0,6$ s). As respostas dos grupos tratados foram comparadas com as respostas observadas antes do tratamento destes mesmos animais (i.e. valores obtidos a cada tempo em relação ao valor basal do próprio grupo), ou à latência de resposta correspondente no tempo manifestada pelo grupo controle tratado com veículo (PBS).

A Figura 9 ilustra a influência da administração i.pl. de diferentes doses de sarafotoxina S6c (10 e 100 pmol) na reatividade à estimulação térmica, em diferentes tempos. O tratamento com o agonista seletivo de receptores ET_B não alterou a sensibilidade ao estímulo térmico, quando comparado com os valores de nocicepção observados antes do tratamento destes mesmos animais, ou em relação à latência de resposta correspondente manifestada pelo grupo controle tratado com veículo (PBS). A co-administração do antagonista opióide não seletivo, naltrexona (5 μ g) não alterou esse perfil de resposta.

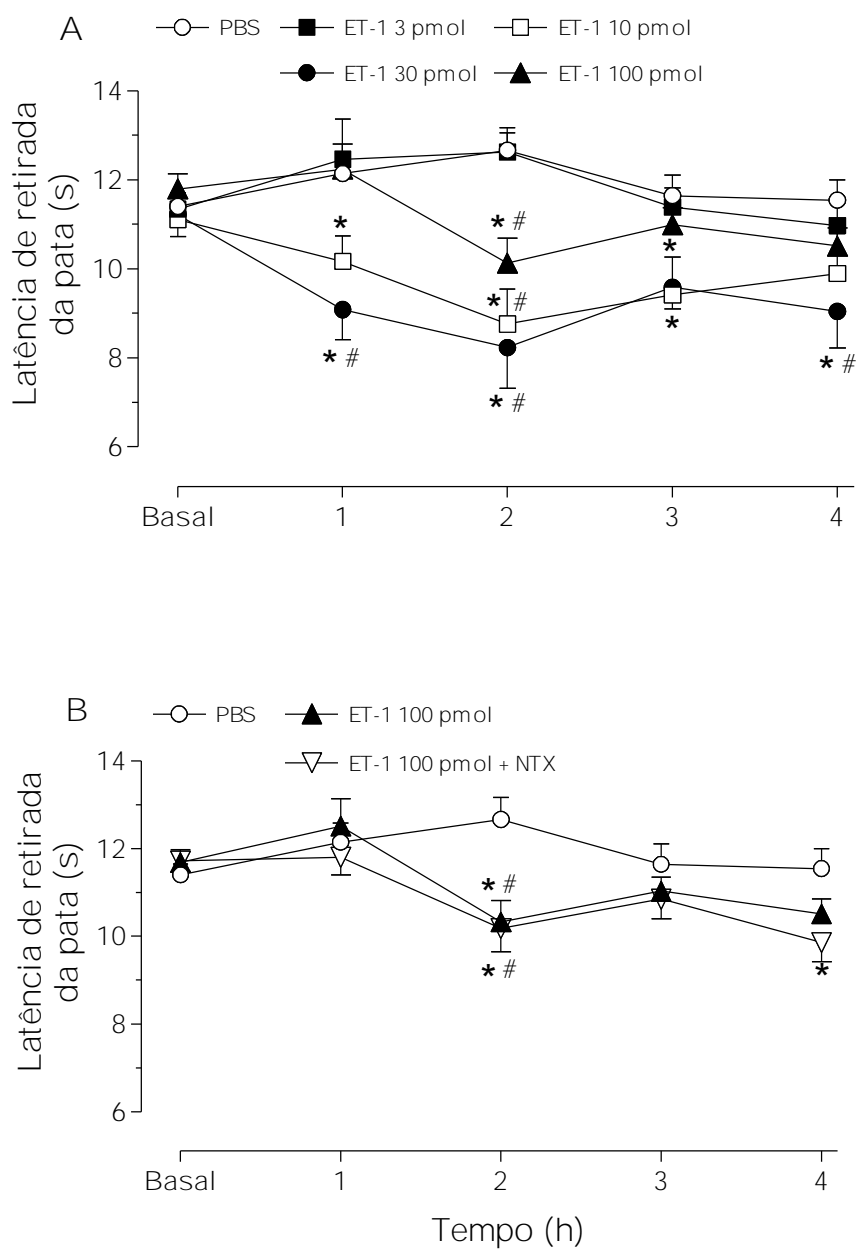


FIGURA 8: Influência da endotelina-1 e da Naltrexona sobre a hiperalgesia térmica. A endotelina-1 induziu um efeito hiperalgésico dependente da dose (Painel A). A maior dose utilizada exibiu um perfil de resposta anti-hiperalgésica, que não foi revertido com a co-administração de naltrexona (Painel B). Os resultados representam a média \pm E.P.M. ($n = 6-8$ animais). Asteriscos (*) e cerquilhas indicam $P < 0,05$ quando comparado ao valor do controle (PBS) e ao valor basal do grupo tratado, respectivamente (ANOVA de medidas repetidas, seguida pelo teste de Bonferroni).

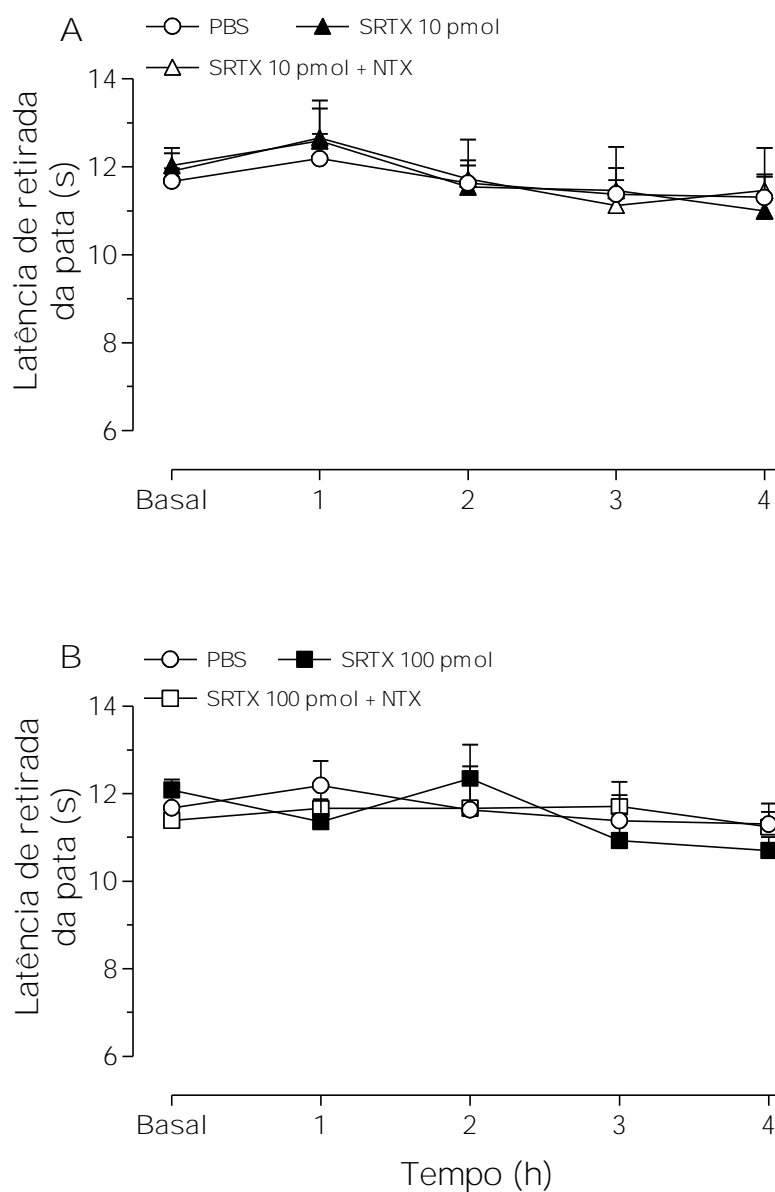


FIGURA 9: Influência da sarafotoxina S6c e da Naltrexona sobre a hiperalgesia térmica. A sarafotoxina S6c nas doses de 10 pmol (Painel A) ou 100 pmol (Painel B) foi administrada sozinha ou em combinação com o antagonista não seletivo de receptores opióides Naltrexona (5 µg/pata), e a latência de retirada da pata frente à aplicação de um estímulo térmico (calor radiante, modelo de *paw flick*) foi avaliada durante 4 h, em intervalos de 1 h. Os resultados representam a média \pm E.P.M. (n = 6-8 animais). Os resultados foram comparados aos do grupo controle (PBS) e ao valor basal do grupo tratado (ANOVA de medidas repetidas, seguida pelo teste de Bonferroni). Não se detectou diferenças significativas ($P > 0,05$).

4.4 - Influência da sarafotoxina S6c sobre a resposta à estimulação mecânica

A estimulação mecânica da pata traseira de camundongos com filamentos de Von Frey de força crescente (0,02 - 2,00 g) permitiu construir uma curva força-resposta, que revelou que o menor filamento capaz de evocar 50% da resposta de retirada da pata estimulada foi o de 1,0 g (Figura 10).

A Figura 11A ilustra a influência do tratamento i.pl. com sarafotoxina S6c em diferentes doses (0,1; 1,0 e 10 pmol) sobre a reatividade à estimulação mecânica. Apesar do agonista seletivo ET_B ter induzido alodinia mecânica na dose de 1 pmol, com redução maior do limiar de retirada da pata tratada na segunda hora (PBS: $0,976 \pm 0,152$ g; sarafotoxina S6c: $0,309 \pm 0,086$ g), foi com a dose de 0,1 pmol que se observou uma redução mais sustentada do limiar para resposta ao estímulo mecânico. Nessa menor dose, a sarafotoxina S6c reduziu o limiar de retirada da pata ipsilateral significativamente a partir da primeira hora ($0,217 \pm 0,065$ g), mantendo o mesmo padrão de resposta até a quarta hora e só voltando ao nível basal 48 horas após a injeção (dados não mostrados). Já o tratamento com uma maior dose desse agonista (10 pmol) reduziu o limiar de retirada da pata tratada apenas na primeira hora ($0,559 \pm 0,121$ g). Contudo, a co-administração desta mesma dose de sarafotoxina S6c junto com naltrexona (5 µg) resultou em diminuição significativamente maior do limiar de retirada da pata na segunda e terceira horas após a injeção (para $0,288 \pm 0,093$ e $0,288 \pm 0,052$ g, respectivamente, Figura 11B).

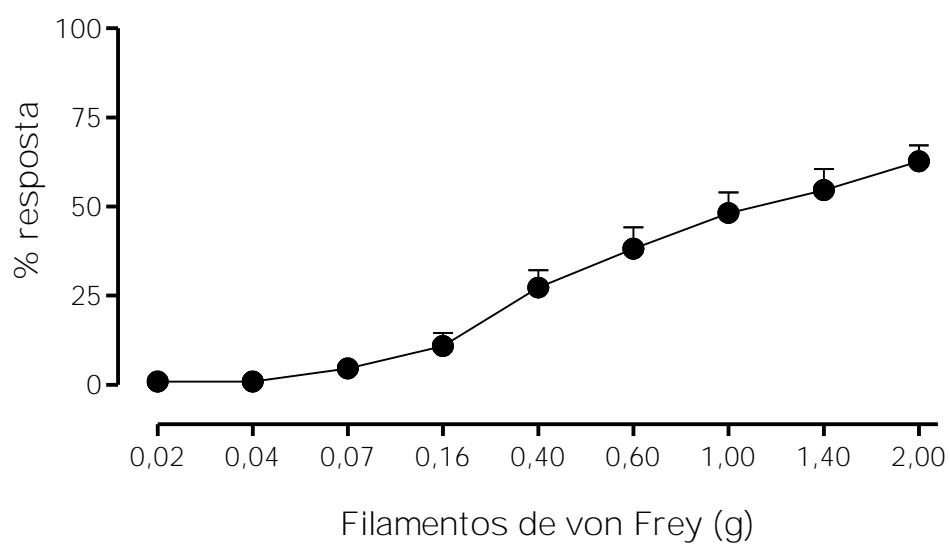


FIGURA 10: Curva força-resposta obtida após estimulação repetida da superfície plantar da pata traseira de camundongos com filamentos de von Frey de peso crescente (0,02 - 2,00 g). Os resultados representam a média \pm E.P.M. (n = 8-10 animais).

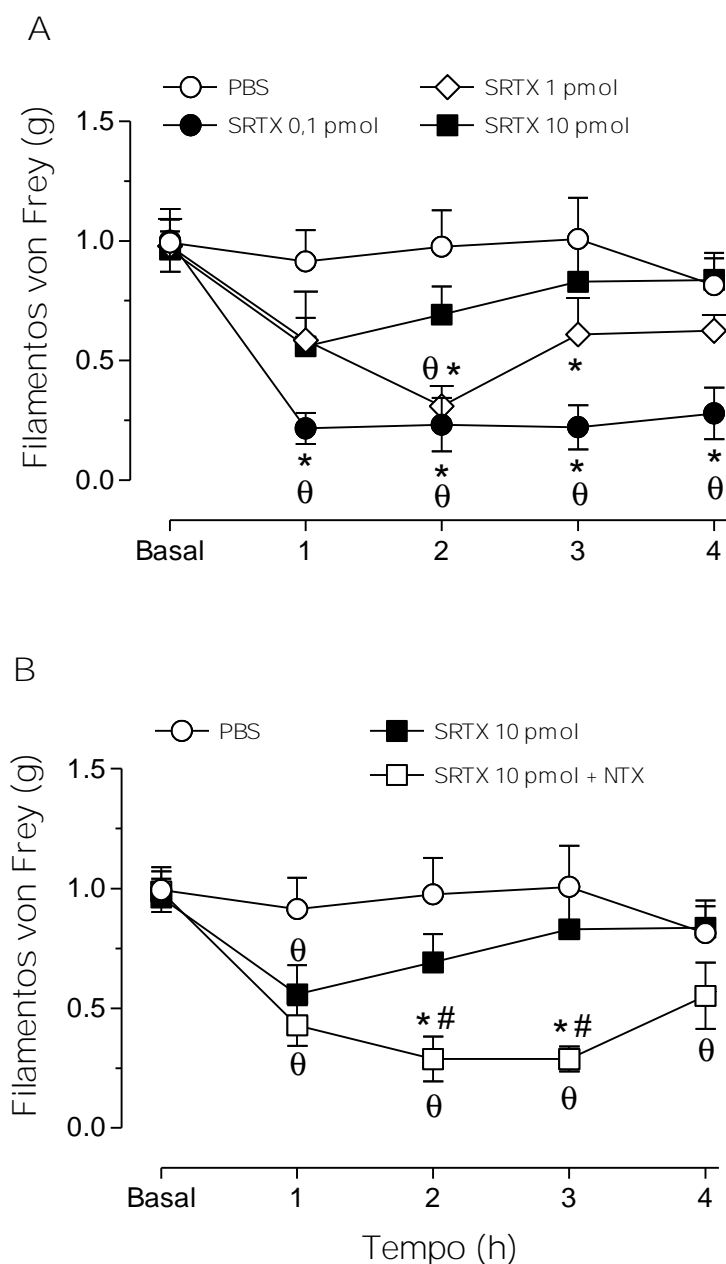


FIGURA 11: Influência da injeção i.pl. de sarafotoxina (SRTX) S6c na alodinia mecânica evocada em camundongos. O Painei A ilustra o decurso temporal da redução do limiar nociceptivo nas primeiras 4 horas após a injeção da sarafotoxina S6c (0,1 -10 pmol i.pl.). O Painei B ilustra o decurso temporal da redução do limiar nociceptivo após a injeção da sarafotoxina S6c sozinha ou em simultâneo com naltrexona (NTX, 5 μ g). Os resultados representam a média \pm E.P.M. (n = 8-10 animais). Asteriscos (*), cerquilhas (#) e o símbolo Teta (θ) indicam $P < 0,05$ quando comparado ao valor correspondente do controle (PBS), ou do tratamento com sarafotoxina S6c (100 pmol) sozinha, ou do valor basal do grupo, respectivamente (ANOVA de Kruskal-Wallis, seguida pelo teste U de Mann-Whitney).

5. Discussão



Os resultados do presente trabalho demonstram, pela primeira vez em camundongos, que a ativação seletiva de receptores para endotelina do tipo ET_B na superfície plantar da pata traseira induz um efeito duplo: 1) hiperalgesia a estímulos álgicos químicos como formalina e capsaicina (mas não térmica a estimulação com calor), bem como alodinia mecânica, e 2) quando estimulados com maior intensidade, supressão da hiperalgesia e da alodinia. Os resultados indicam, ainda, que este papel anti-hiperalgésico dos receptores ET_B, que já havia sido descrito anteriormente nesta espécie (PIOVEZAN *et al.*, 1998, 2000), é mediado por ativação de um sistema opióide local sensível a bloqueio por antagonismo de alguns sub-tipos de receptores opióides.

Diferentemente da ET-1, que ativa tanto receptores ET_A quanto ET_B e potencializou ambas as fases da nocicepção causada por formalina 1%, os agonistas seletivos de receptores ET_B sarafotoxina S6c e IRL 1620 induziram efeito hiperalgésico restrito apenas à segunda fase da resposta ao agente álgico. Tais achados com a ET-1 e a sarafotoxina S6c corroboram integralmente o relato de PIOVEZAN *et al.* (1997). Também é importante ressaltar que as curvas ao efeito hiperalgésico obtidas para ambos os agonistas seletivos de receptores ET_B, sarafotoxina S6c e IRL 1620, apresentaram forma de sino, i.e. na maior dose testada falhou em causar (sarafotoxina S6c, 100 pmol) ou causou menos (IRL 1620, 300 pmol) hiperalgesia. A curva para o efeito potencializador da ET-1 sobre respostas nociceptivas induzidas em camundongo pela injeção i.pl. de capsaicina também apresenta forma de sino (PIOVEZAN *et al.*, 1998, 2000). Ainda, o descenso da parte final desta curva é prevenido pela administração local de um antagonista seletivo de receptores ET_B (BQ-788), ou seja, uma dose elevada e

normalmente inefetiva de ET-1 passa a causar hiperalgesia à capsaicina. Ao contrário, a hiperalgesia à capsaicina induzida por uma dose menor de ET-1 (e que é prevenida por bloqueio de receptores ET_A) ou pela serotonina é abolida pelo tratamento prévio com sarafotoxina S6c ou IRL 1620, respectivamente. Porém, tanto os mecanismos hiperalgésicos acoplados aos receptores ET_A, quanto os anti-hiperalgésicos deflagrados pela ativação local de receptores ET_B, não foram explorados naqueles trabalhos.

Resultados do presente estudo indicam que a estimulação de receptores ET_B também acarreta potencialização das respostas nociceptivas deflagradas por capsaicina ou sensibilização a estímulos mecânicos não nociceptivos (i.e. alodinia), mas não interfere com a reatividade à aplicação de um estímulo térmico (calor). A exemplo da curva hiperalgésica à sarafotoxina S6c obtida para a segunda fase da nocicepção causada por formalina, aquelas para respostas induzidas por capsaicina e estimulação mecânica também se apresentaram em forma de sino. Em outras palavras, receptores ET_B também ativam mecanismos hiperalgésicos e anti-hiperalgésicos, dependendo da intensidade da estimulação dos mesmos. Estudo prévio de PIOVEZAN *et al.* (2000) falhou em demonstrar qualquer evidência para efeitos hiperalgésicos ou anti-hiperalgésicos da sarafotoxina S6c sobre respostas nociceptivas à capsaicina. Esta divergência talvez possa ser atribuída a dois aspectos: 1) à faixa mais limitada de doses de sarafotoxina S6c empregadas naquele estudo (máximas de 30 pmol naquele estudo, versus 100 pmol no presente estudo); e 2) ao intervalo entre o tratamento com o agonista seletivo ET_B e a aplicação do estímulo álgico (30 min naquele estudo, versus 30 e 60 min no presente estudo). Por outro lado, os resultados do

presente estudo correlacionam-se bem com o fato da alodinia mecânica causada por ET-1 na pata de camundongos ser suscetível ao bloqueio tanto por antagonistas de receptores ET_A quanto ET_B (BAAMONDE *et al.*, 2004), ainda que aquele estudo não tenha detectado qualquer função anti-hiperalgésica dos receptores ET_B.

Parece pertinente uma discussão acerca das semelhanças e diferenças entre as respostas nociceptivas deflagradas pela formalina e pela capsaicina. A primeira fase da resposta à formalina (também chamada de fase neurogênica) é atribuída à estimulação direta de nociceptores periféricos que integram as fibras aferentes primárias do tipo C e parte das do tipo A δ (DUBUISSON & DENNIS, 1977). A ativação desses nociceptores, bem como de fibroblastos, mastócitos, neutrófilos e plaquetas, promove a liberação de muitos mediadores inflamatórios, como histamina, serotonina, taquicinas (SP, neurocinina A, neurocinina B) e glutamato (FUJIMAKI *et al.*, 1992; SANTOS & CALIXTO, 1997; CAO *et al.*, 1998; OMOTE *et al.*, 1998; BEIRITH *et al.*, 2002) que, agindo de forma conjunta e/ou sinérgica, sensibilizam as vias nervosas periféricas e centrais de condução do sinal doloroso, dando origem à segunda fase (ou fase inflamatória, mais tardia e duradoura) da resposta nociceptiva à formalina (HUNSKAAR & HOLE, 1987). Entre as duas fases, há uma interfase, na qual o comportamento nociceptivo não é observado, ou seja, há um período de quiescência da resposta nociceptiva. A duração da interfase é determinada pela ativação dos sistemas monoaminérgicos descendentes inibitório e excitatório, que modulam os sinais nociceptivos ao nível do corno dorsal da medula (HENRY *et al.*, 1999). Diferentemente, a capsaicina

atua sobre um alvo específico, os receptores TRPV1, também localizados em fibras aferentes primárias do tipo C e parte das do tipo A δ para causar uma resposta rápida e de duração semelhante à da primeira fase da formalina (SAKURADA *et al.*, 1992). A capsaicina causa essa sensibilização por diminuição do limiar de ativação do nociceptor, bem como recrutamento de nociceptores normalmente silenciosos (SZALLASI *et al.*, 1999). Recentemente, YAMAMOTO *et al.* (2005) demonstraram, através de um estudo *in vitro*, que a ET-1 acentua o aumento da concentração intracelular de Ca²⁺ evocado pela capsaicina, através de receptores ET_A presentes em cultura de neurônios do DRG de camundongos.

Apesar da aparente semelhança entre os mecanismos genéricos que medeiam as respostas nociceptivas, os efeitos distintos do agonista de receptores ET_B sobre respostas da primeira fase à formalina e à capsaicina sugerem que ambos agentes álgicos possam ativar populações diferentes de fibras nociceptivas. Em outras palavras, a formalina talvez estimule fibras adicionais em relação àquelas sensíveis à capsaicina. De todo modo, os resultados claramente demonstram que a resposta nociceptiva à capsaicina não é equivalente à primeira fase da resposta à formalina.

Os resultados indicando que o agonista seletivo de receptores ET_B induziu alodinia mecânica, intensa e duradoura em camundongos, corroboram aqueles de BAAMONDE *et al.* (2004), que revelaram a participação tanto de receptores ET_A quanto ET_B na alodinia mecânica induzida pela injeção i.pl. de ET-1, carragenina ou CFA (adjuvante completo de Freud) nesta espécie. Em ratos, a injeção i.pl. de ET-1, ET-2, ET-3 e BQ-3020, um agonista seletivo de receptores

ET_B, evoca um efeito hipernociceptivo mecânico de forma dependente da dose (CUNHA *et al.*, 2004), sugerindo uma função importante dos receptores ET_B (mas não ET_A) na mediação desse efeito. Além disso, o antagonista seletivo ET_B BQ-788 inibiu, de forma dependente da dose, essa hipernocicepção mecânica induzida pelos três isopeptídeos, enquanto que o antagonista seletivo ET_A BQ-123 falhou a esse respeito e não foi capaz de alterar o grau de inibição causado pelo antagonista seletivo de receptores ET_B, quando ambos foram co-injetados. Contudo, estudos descreveram a atenuação da alodinia mecânica na pata em modelo diabético de dor neuropática em ratos (JARVIS *et al.*, 2000) e hiperalgesia mecânica na inflamação induzida pelo CFA em camundongos (BAAMONDE *et al.*, 2004) por administração de antagonistas seletivos de receptores ET_A.

Dentre os possíveis mecanismos que poderiam mediar os efeitos hiperalgésicos e alodínicos da ET-1, pode-se destacar a degranulação de mastócitos (YAMAMURA *et al.*, 1994; KODA *et al.*, 2000, PIOVEZAN *et al.*, 2004); a liberação de citocinas pró-inflamatórias (STANKOVA *et al.*, 1996), aumento da expressão de moléculas de adesão (DUPERRAY *et al.*, 1995; WATANABE *et al.*, 2000), recrutamento e ativação de leucócitos (GOMES-GARRE *et al.*, 1992; SAMPAIO *et al.*, 2000). Contudo parece pertinente ressaltar que FERREIRA *et al.* (1989) demonstraram que a injeção i.pl. de ET-1 causa uma hipernocicepção mecânica dependente da dose, utilizando o teste de Randal-Selitto modificado em ratos, que não é afetado pelo pré-tratamento com indometacina ou guanetidina, sugerindo uma estimulação direta dos nociceptores pela endotelina. CUNHA *et al.* (2004) também demonstraram que a hipernocicepção mecânica induzida pela injeção i.pl. de ET-1 em ratos não é inibida pelo tratamento com indometacina,

atenolol ou dexametasona. Entretanto, essa resposta hipernociceptiva é potencializada pelo inibidor de fosfodiesterase (rolipram) e inibida por inibidores de PKC, mas não é afetada por um inibidor de PKA (H89). Esses resultados sugerem que as ETs, atuando através de receptores ET_B, induzem hipernocicepção mecânica na pata de ratos, via formação de cAMP e ativação de uma cascata de fosforilação, dependente de PKC. Uma das possibilidades mais plausíveis de ação da ET-1 é a ativação de nociceptores tanto pela despolarização direta quanto pelo aumento de excitabilidade de terminais periféricos de neurônios aferentes primários (YOSHIZAWA *et al.*, 1989; GOKIN *et al.*, 2001). Adicionalmente, fibras sensoriais resistentes à tetrodotoxina (TTX-R) medeiam a dor evocada pela ET-1 aplicada no nervo ciático e contribui para a dor induzida pela injeção i.pl. de ET-1 (HOUCK *et al.*, 2004). Ao nível celular, foram demonstrados que a excitação de neurônios sensoriais nociceptivos é mediada pelo receptor ET_A, e que ocorre aumento das correntes de sódio TTX-R em neurônios isolados do DRG de ratos (CHEN *et al.*, 2000; ZHOU *et al.*, 2001, 2002). Contudo, neurônios sensitivos de pequeno calibre (i.e. fibras C e A δ) não parecem expressar receptores ET_B (POMONIS *et al.*, 2001; PETERS *et al.*, 2004), sugerindo que as células ativadas por agonistas seletivos de receptores ET_B e responsáveis pelos seus efeitos hiperalgésicos ou alodínicos sejam distintas.

Altos níveis circulantes de ET-1 têm sido encontrados em pacientes com dor de origem vascular como, por exemplo, enxaqueca, angina de peito e anemia falciforme (KASKI *et al.*, 1995, GRAIDO-GONZALES *et al.*, 1998; KALLELA *et al.*, 1998). A dor refratária em pacientes com metástases de câncer de próstata tem

sido atribuída à elevada produção de ET-1 por células tumorais, acompanhada de expressão exagerada de receptores ET_A e diminuição da expressão de receptores ET_B (NELSON *et al.*, 1996). Dados clínicos experimentais com atrasentan, antagonista específico de receptores ET_A, têm demonstrado redução significativa da dor em pacientes com câncer de próstata refratário (CARDUCCI *et al.*, 2002; NELSON *et al.*, 2003). Apesar de tantas evidências para um papel preponderante de receptores ET_A na produção de dor e hiperalgesia, as ETs presentes durante a inflamação também podem induzir a liberação de alguns dos mediadores hiperalgésicos através de receptores ET_B. A ET-1 pode atuar em receptores ET_B e ativar células de Schwann na periferia (MAYER *et al.*, 1999; POMONIS *et al.*, 2001), e tem sido mostrado que a estimulação de receptores ET_B (em astrócitos provenientes do cérebro de ratos) induz a liberação de mediadores pró-inflamatórios como TNF- α e IL-6 (MORGA *et al.*, 2000). Esses resultados apontam para um efeito dual da ET-1 no controle da dor induzida pela injeção i.pl. de formalina em camundongos, à semelhança das ações divergentes de vasoconstrição e vasodilatação em tecido vascular mediadas, respectivamente, pelos receptores ET_A e ET_B (RUBANYI & POLOKOFF, 1994).

Provavelmente, o efeito inibitório da ativação do receptor ET_B não decorre através ações diretas sobre as fibras sensoriais, uma vez que tais receptores não têm sido detectados nessas fibras (POMONIS *et al.*, 2001). É mais provável que esse efeito seja resultado de uma ação indireta mediada por outra célula, que leva à supressão da atividade dos nociceptores.

KHODOROVA *et al.* (2002) demonstraram que a co-administração i.pl. de ET-1 na pata de rato, juntamente com o antagonista não seletivo de receptores opióides naloxona ou com o antagonista de receptores ET_B BQ-788 resulta em amplificação da resposta nociceptiva ao peptídeo. Também observaram que o IRL 1620, agonista seletivo de receptores ET_B, em doses elevadas (100 e 200 pmol) inibe a resposta nociceptiva à ET-1, quando co-administradas na pata de ratos, bem como o aumento dos disparos de potenciais de ação em fibras-C, isoladas de ratos. Ambos efeitos inibitórios do IRL 1620 também foram prevenidos pela naloxona, antagonista não seletivo de receptores opióides.

As evidências coletadas neste trabalho sugerem a participação de peptídeos opióides na modulação do efeito anti-hiperalgésico mediado pelos receptores ET_B, nos modelos de nocicepção química (formalina e capsaicina) e mecânica, em resposta à administração de doses elevadas de sarafotoxina S6c. Essas evidências, obtidas através do emprego do antagonista opióide não seletivo naltrexona, corroboram os resultados daqueles autores e incluem:

- 1) bloqueio do efeito inibitório da sarafotoxina S6c sobre a hiperalgesia à formalina (porém apenas na segunda fase);
- 2) prevenção do efeito anti-hiperalgésico do agonista seletivo de receptores ET_B no teste da capsaicina;
- 3) potencialização da alodinia mecânica induzida por dose elevada do agonista seletivo ET_B.

É interessante notar que a primeira fase da resposta à formalina não foi afetada com nenhum dos tratamentos, nem mesmo com a naltrexona. Este achado só reforça a idéia de que a resposta nociceptiva à capsaicina não é

equivalente à primeira fase da resposta à formalina, como anteriormente proposto. Podemos salientar que essa ausência de efeito na primeira fase à formalina não depende do tempo de tratamento, uma vez que nem mesmos os animais tratados 60 min antes tiveram essa resposta alterada (dados não mostrados).

Esses resultados sugerem uma modulação do efeito inibitório decorrente da ativação de receptores ET_B por peptídeos opióides liberados periféricamente, que atuam em receptores opióides presentes no terminal nociceptivo e contribuem para a analgesia endógena periférica (FIELDS *et al.*, 1980; STEIN *et al.*, 1993). De fato, há evidências de que a hiperalgesia associada a condições inflamatórias pode ser parcialmente contida por um sistema antinociceptivo envolvendo leucócitos e seu conteúdo opióide. Durante a inflamação, leucócitos secretam peptídeos opioidérgicos que se ligam a receptores em neurônios sensoriais periféricos e medeiam a antinocicepção. Esta secreção pode ser induzida por estresse ou injeção local de fator liberador de corticotrofina (CRF) (MOUSA *et al.*, 2003). Em humanos, peptídeos opioidérgicos liberados localmente diminuem a intensidade da dor e o consumo voluntário de medicamentos analgésicos em condições de estresse pós-cirúrgico (STEIN *et al.*, 1993). O mecanismo pelo qual os opióides induzem analgesia periférica envolve a participação dos receptores opióides *mu*, *kappa* e *delta* (FERREIRA & NAKAMURA, 1979a,b; FERREIRA *et al.*, 1984; STEIN *et al.*, 1988, 1989, 1990; KAYSER *et al.*, 1991). Estudos sugerem que a analgesia promovida por ativação destes receptores possa ser mediada por geração de óxido nítrico a partir da L-arginina e ativação de guanilato ciclase (FERREIRA *et al.*, 1991a,b, 1995; GRANADOS-SOTO *et al.*, 1997; NOZAKI-TAGUCHI e YAMAMOTO, 1998).

A maioria dos leucócitos que contêm peptídeos opioidérgicos na fase inicial da inflamação é do tipo polimorfonuclear (PMN), enquanto que os monócitos predominam durante a fase mais tardia (RITTNER *et al.*, 2001). Tanto esses leucócitos circulantes quanto o endotélio vascular expressam moléculas de adesão, que promovem a migração de leucócitos para o local da inflamação. No entanto, este importante passo na resolução do processo inflamatório pode ser bloqueado por anticorpos anti-moléculas de adesão, prejudicando assim a antinocicepção mediada por opióides (STEIN *et al.*, 2003; MACHELSKA *et al.*, 1998, 2002, 2004). Por outro lado, o recrutamento de leucócitos polimorfonucleares mediado por quimiocinas intensifica os processos de rolamento, diapedese e extravasamento de células, através do aumento da expressão das moléculas de adesão (ZHANG *et al.*, 2001).

Como a sarafotoxina S6c não induz uma resposta edematogênica, e o recrutamento de células inflamatórias pela ET-1 tem sido atribuído aos receptores ET_A e não ET_B (ZOUKI *et al.*, 1999; SAMPAIO *et al.*, 2000), talvez este não seja o mecanismo pelo qual ocorra a liberação de opióides e sim outro, envolvendo tipos celulares diferentes. Dentre as células cutâneas, os queratinócitos são estreitamente associados a axônios sensoriais e modulam a atividade de nociceptores cutâneos (LEWIN & MANDELL, 1993). Também possuem receptores ET_B e expressam e secretam ET-1 (a exemplo de cardiomiócitos e células cancerosas; AHN *et al.*, 1998; PERNOW & WANG, 1997; WACNIK *et al.*, 2001) além de peptídeos opióides, de modo que podem ser os possíveis mediadores do efeito antinocicepivo mediado pelos receptores ET_B. Os achados deste estudo obtidos utilizando antagonistas seletivos de distintos sub-tipos de receptor opióide

indicaram que os receptores opióides envolvidos no mecanismo analgésico deflagrado por doses elevadas de agonistas seletivos do receptor ET_B em camundongos, ao menos no que se refere à segunda fase da resposta nociceptiva à formalina, são do tipo *mu* e *kappa*, mas não do tipo *delta*. Especificamente, os antagonistas seletivos dos receptores opióides do tipo *mu*, CTOP e naloxonazina, e do tipo *kappa*, nor-BNI, desmascararam efeitos hiperalgésicos marcados para 100 pmol de sarafotoxina S6c, mas o antagonista seletivo *delta* naltrindole falhou nesse quesito. Esses dados corroboram essencialmente aqueles de KHODOROVA *et al.* (2003), em que a ativação de receptores ET_B desencadeia uma cascata analgésica endógena na qual ocorre liberação de β -endorfina de queratinócitos, que atua sobre receptores opióides *mu* e *kappa*, mas não *delta*, localizados nas terminações de fibras sensitivas. Estes receptores promovem hiperpolarização neuronal, mais provavelmente como consequência da ativação de canais retificadores de entrada de potássio (GIRK) e, em última instância, suprimem a dor. Por outro lado, seria interessante desvendar, em estudos futuros, a contribuição de cada um dos sub-tipos de receptores opióides envolvidos no controle inibitório da informação nociceptiva decorrente da ativação de receptores seletivos ET_B locais, na nocicepção à capsaicina e alodinia mecânica em camundongos. É interessante comentar ainda que WU *et al.*, (2002) também sugeriram que a injeção i.pl. de formalina em camundongos ativa o sistema β -endorfinérgico a nível supraespinal e induz liberação de β -endorfina, que, por sua vez, exerce efeito inibitório sobre a resposta nociceptiva. Além disso, demonstraram que esse efeito é mediado através de receptores *mu*-opióides.

Dados de trabalho anterior (MURRY & COWAN, 1991) já sugeriam a participação de receptores opióides dos tipos *mu* e *kappa*, mas não *delta*, modulando a percepção da dor tônica em camundongos a nível espinhal e supraespinhal.

Os nossos achados de que a modulação do efeito antinociceptivo mediado por receptores ET_B na alodinia mecânica em camundongos, é decorrente de liberação endógena de peptídeos opióides é consistente com as observações de VERRI *et al.* (2004), de que as ETs estão envolvidas na hipernocicepção mecânica induzida pela IL-18 em ratos, e que esse efeito é mediado por receptores ET_B, uma vez que BQ-788, mas não o BQ-123, inibiu essa hipernocicepção de forma dependente da dose. Além disso, este efeito hipernociceptivo mecânico da IL-18 foi inibido pela administração local de morfina que, por sua vez, foi bloqueado pela naloxona. MENÉNDEZ *et al.* (2003) também demonstraram que a morfina inibe a ação nociceptiva da ET-1.

Além de causar ativação dos nociceptores, induzindo diretamente nocicepção, existem várias evidências de que a ET-1 também causa hiperalgesia a estímulos térmicos. O provável mecanismo envolvido é a sensibilização de fibras aferentes primárias nociceptivas localizadas na pata, bem como a sensibilização de neurônios do sistema nervoso central (RAJA *et al.*, 1984; KOLTZENBERG *et al.*, 1994; MEYER *et al.*, 1994; WILLIS *et al.*, 1994). Esse efeito hiperalgésico da ET-1 sobre a nocicepção térmica em camundongos parece não envolver receptores ET_B e sim ET_A, uma vez que o agonista seletivo para receptores ET_B (sarafotoxina S6c, 10 e 100 pmol) falhou como droga hiperalgésica, enquanto que a ET-1 foi eficaz a esse respeito. Entretanto, com o aumento da dose (para 100 pmol) desapareceu o efeito hiperalgésico da ET-1. Essa hipótese é reforçada

pelos resultados obtidos por MENÉNDEZ *et al.* (2003), que, utilizando antagonistas seletivos de receptores ET_A (BQ-123) e ET_B (BQ-788), demonstraram que a hiperalgesia térmica induzida pela injeção i.pl. de ET-1, no teste da placa quente unilateral (UHP), é mediada por receptores ET_A e não ET_B. BAAMONDE *et al.* (2004) também tiveram resultados parecidos utilizando os mesmos antagonistas seletivos de receptores ET_A e ET_B, ao avaliar a hiperalgesia térmica induzida por carragenina e CFA em camundongos, no teste de UHP.

Por outro lado, diferentemente do observado com estimulação química (formalina e capsaicina) e mecânica, o efeito antinociceptivo observado com a maior dose de ET-1 utilizada na estimulação térmica, não foi revertido pelo antagonista opióide. Este resultado, em conjunto com a ausência de efeito do agonista seletivo de receptores ET_B, leva à hipótese de que o efeito antinociceptivo periférico da ET-1 na hiperalgesia térmica não é modulado pela liberação periférica de opióides. Na certeza de que a dose injetada de ET-1 (100 pmol) induz, por si só, uma resposta comportamental nociceptiva em camundongos (PIOVEZAN *et al.*, 2000), pode-se sugerir que o efeito antinociceptivo da ET-1 decorra da dessensibilização e internalização dos receptores ET_A, dessensibilização dos nociceptores ativados pela ET-1 no período inicial após a sua administração e/ou da intensa vasoconstrição cutânea promovidas pelo peptídeo.

Em conclusão, conforme ilustra o esquema apresentado na Figura 12, os resultados obtidos no presente estudo estabelecem um papel dual para receptores ET_B para endotelinas na modulação da sensibilidade de camundongos à aplicação de estímulos álgicos químicos e mecânico, mas não térmico, à pata. Agonistas

seletivos destes receptores ET_B evocam hiperalgesia ou alodinia a estes estímulos, mas quando a estimulação é excessiva, tais receptores também deflagram uma analgesia dependente da ativação de um sistema opioidérgico local, em mecanismo que possivelmente envolve a liberação de β -endorfina por queratinócitos e a estimulação de receptores opióides dos tipos *mu* e *kappa*.

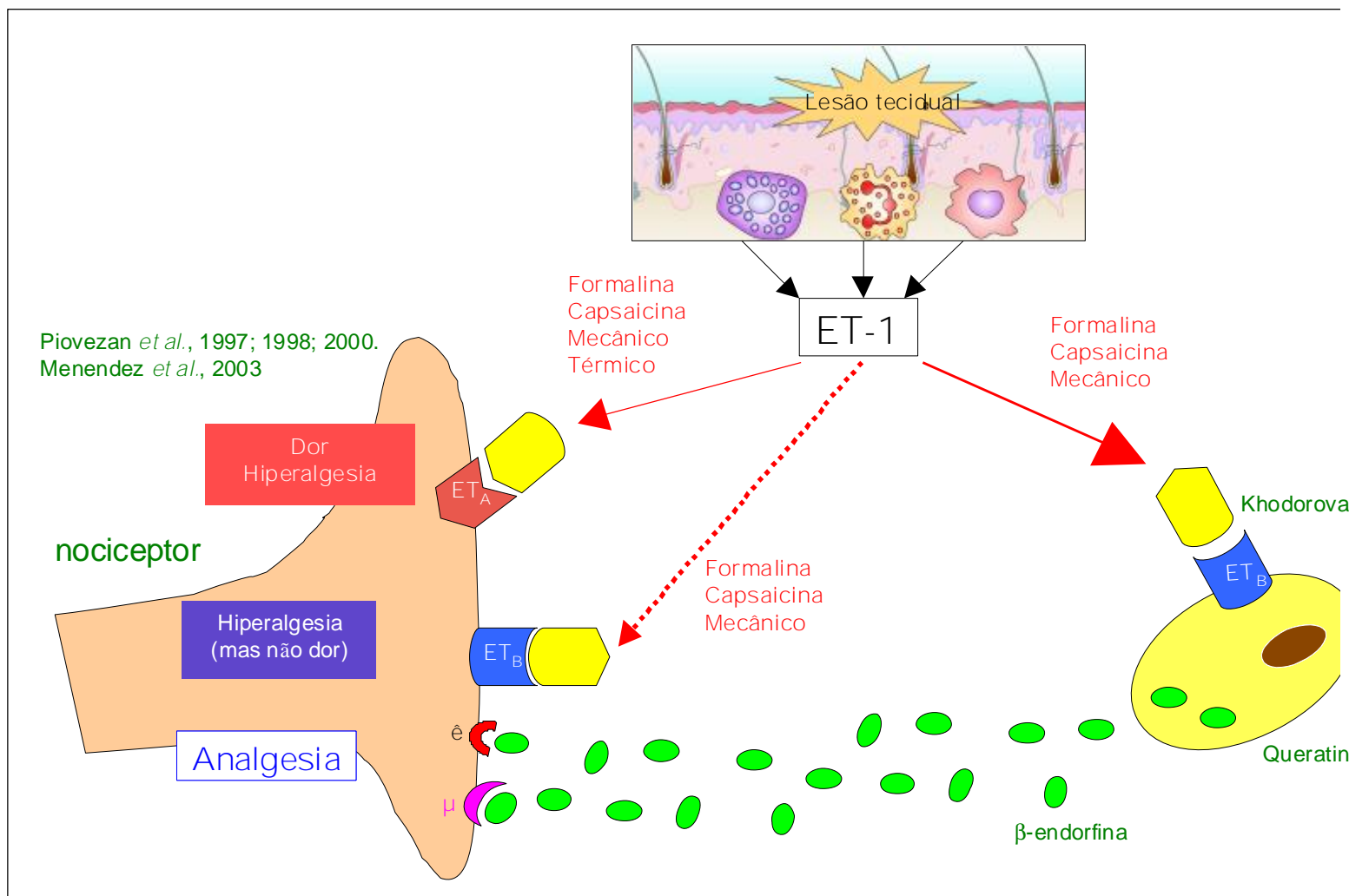


FIGURA 12: Esquema proposto para o mecanismo de ação da ET-1 sobre os seus receptores específicos, ET_A e ET_B, após estimulação química, térmica e mecânica. k e μ representam os receptores opióides k e μ, respectivamente.

6. Conclusões



Os resultados do presente estudo permite concluir, de modo geral, que em pata de camundongos:

- 1) tanto a injeção de ET-1 quanto a de sarafotoxina S6c potencializam a segunda fase da resposta nociceptiva à formalina, mas somente a ET-1 é eficaz em potencializar também a primeira fase dessa resposta;
- 2) a administração intraplantar de endotelina-1 ou sarafotoxina S6c também acarreta hipernocicepção mecânica, mas apenas a ET-1 também causa hipernocicepção térmica;
- 3) a estimulação excessiva de receptores ET_B deflagra um mecanismo anti-hiperalgésico que limita as respostas a estímulos químicos (formalina e capsaicina) ou mecânicos, mas não térmicos (calor);
- 4) este efeito anti-hiperalgésico que ocorre com relação a respostas à estimulação química ou mecânica é dependente da ativação de um sistema opioidérgico, que acarreta em liberação local de peptídeos opióides, que atuam sobre receptores opióides *mu* e *kappa* periféricos possivelmente localizados em terminais nociceptivos periféricos;
- 5) o efeito anti-hiperalgésico contra respostas à estimulação térmica, causado por dose elevada de ET-1 e mediado por receptores ET_A, independe de liberação local de peptídeos opióides.

